

dc\_1009\_15

**Klinikai és molekuláris vizsgálatok  
colon tumorok progressziója során**

**MTA doktora pályázat  
Doktori értekezés tézisei**

**Dr. Damjanovich László**

**Debreceni Egyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Intézet**

**Debrecen, 2015.**

## Bevezetés

A colorectalis carcinomák eredete multifaktoriális, kialakulásukban környezeti és öröklődő tényezők egyaránt változó mértékű szerepet játszanak az egyes betegekben. Az érintettek 70-80%-ának sporadikus tumora van, öröklött tényezőnek nincs bizonyítéka. A további 20-30 %-ban mutatható ki családi halmozódás, ahol öröklött géneknek is szerepe lehet a daganat kialakulásában. A CRC a második leggyakoribb daganat világszerte és valószínűleg az egyik legtöbbet vizsgált tumoros elváltozás is. A teljes humán genom megismerése nagy momentumot adott a tumor asszociált gének jelentős részének megismeréséhez. Ma már általánosan elfogadott nézet, hogy a CRC kialakulása során mintegy 60-80 gén mutációja következik be, melynek kb. egy negyede magáért a daganat progressziójáért felelős. Az ismert genetikai háttérű öröklött daganatok eseténben specifikus gének mutációi adódnak át részben, vagy teljesen a következő nemzedéknek. Szinte nincs olyan aspektusa az anyagcserének, mely ne változna meg a daganat progressziója során, a sejt életciklusát a túlélés és további osztódás felé tolva el. Egyidejűleg a változások minőségi és mennyiségi jelei a plazma membrán fehérje és lipid összetételében és a receptorok egymáshoz viszonyított elhelyezkedésében (a receptor topográfiában) is megnyilvánulnak, melyek funkcionális következtetések levonására adnak lehetőséget.

Az értekezésben összefoglalt közleményekben a CRC-vel két megközelítés alapján foglalkoztunk. **Klinikai munkánk során a Lynch szindrómás betegek vizsgálatára** koncentráltunk. Nem foglalkoztunk a FAP és variánsaival (AFAP, Gardner és Turcot szindróma), sem a Peutz-Jeghers-, vagy a Familiáris juvenilis polipózissal, a hyperplasztikus polipózis szindrómával csak olyan mértékben, hogy elkülöníthessük őket az LS-től. Motivációként szolgált az, hogy a LS a leggyakoribb öröklődő CRC forma, ennek ellenére a klinikai gyakorlatban világszerte kevésbé kerül felismerésre, a családtagok genetikai

vizsgálata hiányos és a daganatok kezelésében a megelőzés lehetősége messze nincs kihasználva.

Értekezésem második részében azon vizsgálatainkról szeretnék beszámolni, melynek során egy **CRC sejtvonala epithelsejtjei (LS-174-T) és colon tumoros, valamint Crohn betegekből származó limfociták sejt felszíni (plazma) membránjának bizonyos receptorai által alkotott mintázatát** elemeztük. Ezen vizsgálatok paradigmájául azok a közlések szolgáltak, melyek alátámasztják, hogy a membrán fehérjék nem véletlenszerűen helyezkednek el a sejtmembránban, hanem hierarchikus rend mutatható ki a molekuláris (nanoscale), a „mesoscale” (akár több száz nanométer) és a mikrométeres tartományban. A membrán által határolt sejt koncepciója mintegy 175 évre tekint vissza. A mai elképzelés alapja az 1970-es évek elején publikált Singer-Nicolson folyékony mozaik membrán modell (Singer 1972). Bár alapvetően folyadék jellemzőkkel bír a mai membrán modell is, a legújabb ismeretek szerint a proteinek nem random módon helyezkednek el a lipid kettősrétegben, hanem számos kitüntetett terület, „microdomain” létezik, melyek inkább „gél” állapottal jellemezhetők. Ezek a speciális lipid összetételű membrán területek néhány 10 nm-től mikrométer nagyságig is terjedhetnek, a membrán akár 60-80% borítva (Lombard 2014). A microdomain („lipid tutaj”, vagy „lipid raft”) fehérje komponensei jellemzőek egy-egy raft típusra, a térbeli közelség miatt kapcsolatba léphetnek egymással és/vagy ligandjaikkal az adott receptor alegységek, ill. a nagy koncentrációban jelen levő fehérjék erősíthetik a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását és a stimulus által kiváltott reakciót (de Bakker 2007). A lipid tutaj kitüntetett szerepére utalnak azok az eredmények is, melyek szerint, ha koleszterin kivonásával megbontjuk a raft szerkezetét, a korábban rendezetten elhelyezkedő MHC molekula komplexek random eloszlást mutatnak a membrán egyéb területein is (Anderson 2000, Vereb 2000, Lebedeva 2004, Vámosi 2004,)

Membrán vizsgálataink során két fő módszert alkalmaztunk, az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert (FRET, FCET) (Szöllősi 2002) a nanométeres skálán az intra- és intermolekuláris proximitás mérésekre és a konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát, a mikrométeres távolsági tartományban. Méréseink során olyan molekulák jelenlétét, mintázatát vizsgáltuk, melyek egy bizonyos típusú lipid tutajban helyezkednek el és számos limfoid és nem limfoid sejtvonal esetében bizonyított szereppel rendelkeznek az immunfelismerés, antitumor immunitás (MHCI, ICAM-1), a limfocita homing, metasztázisképzés (ICAM-1, CD44s) és a differenciálódás-sejthalál folyamatában (IL-2/15R  $\alpha$  és  $\gamma$  alegységek, CD59-komplement inhibitor). Az egyes receptorok abszolút számának kontrollhoz képest mért eltérésein kívül, korábban limfómás és más tumoros sejtvonalakon leírt receptor mintázatokhoz hasonló kolokalizációt tudtunk megfigyelni az általunk vizsgált receptorok között az **LS-174-T colon tumoros sejtvonal** epitéliumon is. IFN- $\gamma$  stimulusra adott, reprodukálható mintázatváltozást is meg lehetett figyelni az ICAM-1 és az MHCI alegységek között. További vizsgálatokkal igazoltuk, hogy ez a kiváltott reakció ICAM-1 siRNS alkalmazásával kvantitatív módon blokkolható volt. Nem csak tumoros epitheliumot, hanem vastagbél daganatos és Crohn betegségben szenvedő betegek perifériás véréből, valamint nyirokcsomóiból származó **CD4<sup>+</sup> limfocitákat** is vizsgáltunk. Célunk egy komplexebb receptor kolokalizáció vizsgálata volt. A kapott „mintázatok” eredményei alapján azt gondoljuk, hogy a CD4<sup>+</sup> sejtek felszínén gyulladásos és tumoros betegségekben a vizsgált receptorok által alkotott lipid raft szerkezete átalakul. Az IFN- $\gamma$  hatására létrejött molekuláris átrendeződés arra mutat, hogy specifikus célzott terápia esetén nem csak az adott target molekula jelenléte és megfelelő számossága, hanem más molekulákhoz viszonyított topográfiája is szerepet játszhat a kiváltott hatásban.

Az értekezés befejezéseként egy új klinikai vizsgáló eljárásról adok számot, mely jelentősen hozzájárulhat az intraoperatív tumor diagnosztikához, akár már a közeljövőben.

Több sebész munkatársammal együtt lehetőségünk volt csatlakozni egy fizikusokból, matematikusokból, orvosokból álló munkacsoporthoz, akiknek már jelentős tapasztalatuk volt biológiai szövetek **tömegspektrometriás elemzésében**. A sebészi elektromos vágó-koaguláló eszköz („elektromos kés”) használata közben keletkező füstöt elvezetve, a lipid komponensek spektrális eltéréseit elemezve jellemző különbséget lehetett kimutatni tumoros és normál szövetek között. Az azonosított molekulák között foszfatidiletanolamin, foszfatidilkolin, foszfatidsav, foszfatidilszerinek, foszfatidilinozitolok, szfingomielinek kardiolipinek, plazmalogének és szulfatidok szerepeltek. Az eljárás nagyon gyors, szinte „real time” üzemmódot tesz lehetővé és a mérések szerint átlagosan 95-100% szenzitivitással, valamint 92-100% specifitással dolgozik. A számos mérés közül elsősorban a CRC és azok máj áttéteinek vizsgálatában vettem részt. A mérések a műtét menetét gyakorlatilag nem befolyásolják. Az eddigi eredmények alapján ez a mérési módszer a nehéz anatómiai viszonyok között végzett beavatkozások közben segítheti a döntéshozatalt az ún. R0 reszekciók (teljes tumormentesítés) kivitelezésben. A módszer különösen sokat jelenthet olyan nehéz helyzetekben, amikor nagyon kicsi a mozgási lehetőség arra, hogy a sebészi metszésvonalat „messze” az ép szövetben vezetve operáljunk, azaz a tumor szabad szemmel jól láthatóan, teljes egészében eltávolítható legyen.

## **Célkitűzések**

### **I. HNPCC/LS betegek vizsgálata**

1. Az LS szűrés bevezetése a klinikai gyakorlatunkba, HNPCC/LS adatbázis létrehozása
2. Az IHC és MS alapján kiszűrt betegek genetikai eltéréseinek vizsgálata
3. Családfa analízisek, a genetikai eltérések elemzése
4. A betegek és mutáció hordozó családtagjaik gondozásba vétele, tanácsadás

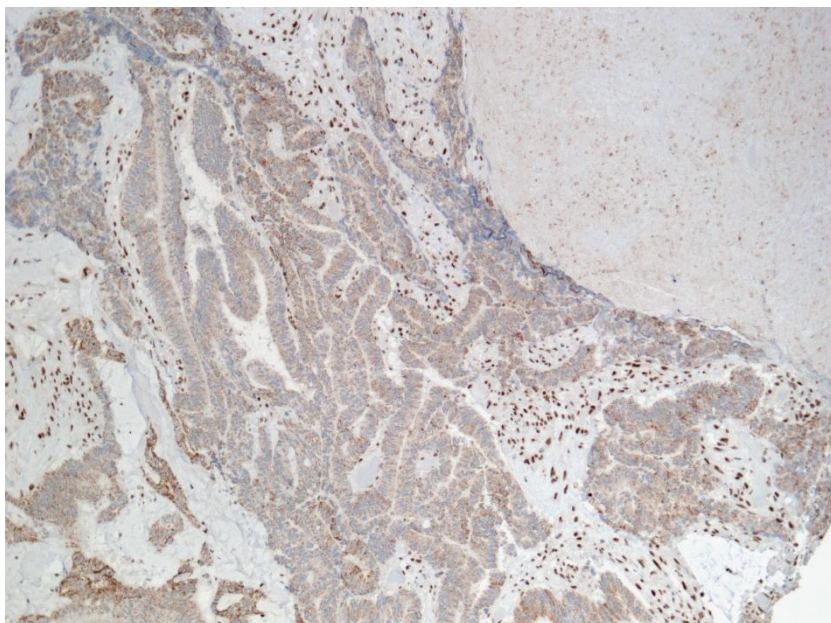
### **II. CRC sejtvonala epithel sejtjeinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata**

1. LS-174-T CRC sejtvonala plazma membránjának vizsgálata IFN- $\gamma$  hatására az MHCI és ICAM-1 vonatkozásában
2. LS-174-T CRC sejtvonala plazma membránjának vizsgálata ICAM-1 siRNS hatására az MHCI és az ICAM1 vonatkozásában
3. CD4+ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata CRC betegek nyirokcsomóiban és perifériás vérében
4. CD4+ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata Crohn betegek nyirokcsomóiban és perifériás vérében
2. CRC betegek primer tumorának és máj metasztázisainak vizsgálata tömegspektrometriás mérésekkel

## Eredmények és megbeszélés

### I. 1-2. HNPCC/LS adatbázis létrehozása, genetikai eltérések vizsgálata

A HNPCC adatbázisunk alapjait 2003-ban hoztuk létre. Az 1997-től 2003-igterjedő időszakot retrospektíven, kérdőívek segítségével elemeztük. A CRC miatt műtéten átesett betegeink családfáját az Amsterdam és a Bethesda Kritériumoknak megfelelően vettük fel. A lekérdezés 2004-óta prospektíven zajlik, még a primer műtét bentfekvése idején. Az adatbázisunk 1576 betegét kérdeztük le, 1341-et (84%) minősítettünk sporadikus előfordulású CRC-nak. Valamennyi betegünk közül 69 (4.4%) teljesítette az AC, 166 beteg (10.5%) a BG feltételeit. Összesen 153 betegnél végeztük el az IHC és MSI vizsgálatokat a 235 potenciálisan pozitív betegből (48-AC, 105-BG arányban). A vizsgálatok száma a megfelelő minták hiánya miatt lett kevesebb a tervezettnél (kezdeti, retrospektív vizsgálati fázis). Az Amszterdam pozitívak közül 15 (31%), a Bethesda pozitívak közül 19 (18.1%) bizonyult MSI-H-nak. A 34 mutáció analízis és szekvenálás során az első csoportból 9 családban (az AC pozitívak 60%-a)



**I.4. ábra Colon tumorból metszet.** A tumor sejtek magfestődésének hiánya (barna, DAB) az MSH6 fehérje hiányát jelzi.

igazoltunk 8 különböző patogén mutációt, második csoportból 5 családban 5 különböző patogén mutációt (a BG pozitívak 26%-a) (Kámory 2006, Tanyi 2014). A feltárt patogén mutációk közül 5 bizonyult eddig még ismeretlennek, ill. a vizsgálataink természetesen feltártak már leírt allél variációkat is (Tanyi 2014). A 14 mutációból mindössze egy mutatott ismétlődést 3 különböző, genetikailag független családban, időben egymástól távol végzett vizsgálatok során (Tanyi 2012).

Esetszámaink nemzetközi összehasonlításban nem nagyok, de korábban hazai viszonylatban csak Papp és mtsai adtak hírt nagyobb anyagról (Papp 2007). Húsz HNPCC-s és 16 HNPCC gyanús család vizsgálatáról számoltak be. A 18 rokon kapcsolatban nem levő betegben 18 mutációt észleltek. Ezek között 16 patogénnek mutatkozott, valamint 9 még nem szerepelt az adatbázisokban, így új mutációként közölték. Ismétlődő variánst ez a munkacsoport sem talált. Tímár és mtsai 2009-ben a Nemzeti Onkológiai Konzorcium nevében megjelentetett összefoglalójukban 57 család vizsgálatáról adnak jelentést (Tímár 2009). Tizennyolc patogén mutációt találtak, 9 MLH1 és 9 MSH2 megoszlásban. Ismétlődés, azaz „founder” mutáció itt sem mutatkozott. Az eltérések fele új volt, valamint 7 besorolatlan variánst is találtak. A fenti vizsgálatokkal negatívnak bizonyult, de anamnesztikusan pozitív családok további vizsgálata során 5 EPCAM mutációhoz köthető, epigenetikus MSH2 elnémulást is kimutattak. Érdekes az összehasonlítás a hazai és a finn, valamint balti populációkkal, ahol a lélekszám nagyságrendi hasonlósága mellett egyértelmű founder mutációt is találtak (Chapelle 1998. Nystrom-Lahti 1994, 1996.) „Founder mutációra” saját vizsgálataink során sem bukkantunk, az egyetlen ismétlődő variáns az MLH1 c.143A>C (p.Q48P) volt, három genetikailag nem rokon családban találtuk meg, különböző vizsgálatsorok alkalmával (Tanyi 2012).



### I.3. Családfa analízisek, a genetikai eltérések elemzése

A családfa analízisek, és az egyes családok, családtagok betegség szemlélete számos tanulsággal szolgáltak a hazai helyzetre vonatkozóan. Hazánk földrajzi mérete ellenére sok esetben egy család ellátása több egészségügyi intézményben történik, a beteg érdekében történő adathozzáférés pedig sajnálatosan esetleges. A családi anamnézis megfelelően részletes felvétele intézményeinkben nem általános. Szomorú példák sorával találkozhatunk a lakosság egészségtudatosságát illetően is. A következő nyolc családon keresztül a jellemző eseteket mutatom be. A családfák elkészítéséhez standardizált jeleket használtunk (Bennett 2008).

#### 1. Család

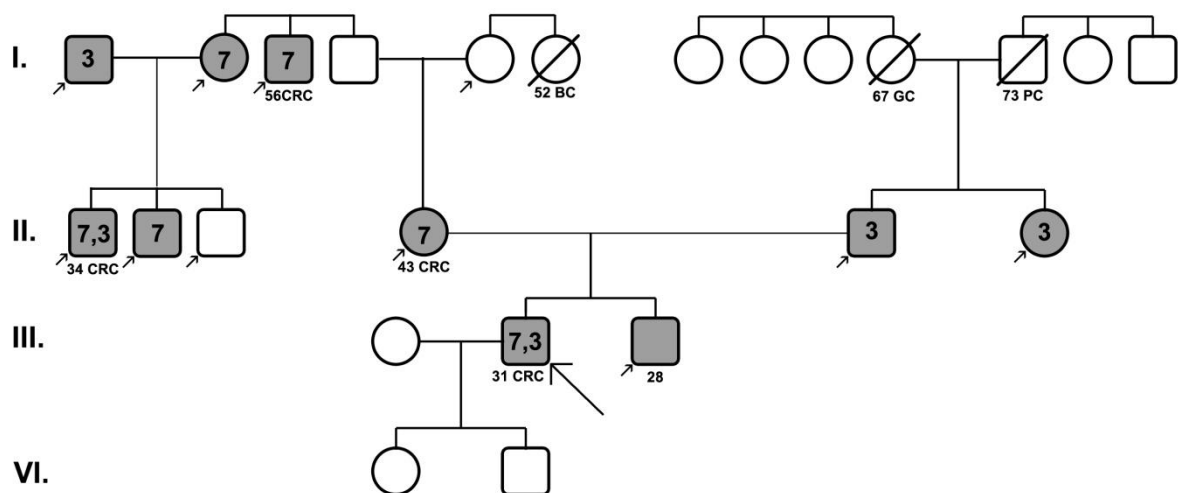
A 31 éves férfibeteg flexura lienalis carcinoma miatt került műtetre. Családi anamnézisében édesanyja 43 évesen, anyai nagyapjának testvére 56 évesen, és az index személy unokatestvére 34 évesen szenvedett vastagbél daganatban (I.5. ábra). Összesítve az anyai ágon 4 vastagbél és 1 emlődaganat fordult elő elsőfokú rokonok között, az apai ág egy gyomor és egy tüdődaganat által volt érintve. Immunhisztokémiával az MSH2 festődés hiányát tapasztaltuk, míg az MLH1 pozitív maradt. Az MSI státusz magas instabilitást igazolt. Mindkét gén valamennyi exonját szekvenáltuk, melynek során az MLH1 génben nem találtunk eltérést az immunhisztokémiához hasonlóan. Az MSH2 esetében két mutációt sikerült igazolni, a 7. exon 422.kodon Glu → STOP cserét kialakító nonszensz mutációt, valamint a 3. exon 127. kodon Asp → Ser változást kiváltó misszensz mutációt. A szükséges felvilágosítás után 12 családtag vérmintájából izoláltunk DNS-t. Vizsgálataink alapján az anyai ágon 5 személy hordozza a 7. exonban található nonszensz mutációt, köztük 3 személy vastagbél daganatban szenvedett. A 3. exon mutációja két apai ági családtagban volt kimutatható, valamint az anyai ágon is két személyben. A két mutáció együttes előfordulása 3

családtagban volt fellelhető. Az emlő, tüdő- és gyomordaganatos rokonokat elhalálozás miatt nem sikerült kivizsgálnunk.

Eredményeinket összevetettük az akkor legaktuálisabb nemzetközi mutációs adatbázissal (The Human Gene Mutation Database, Cardiff, International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors)

A 7. exon nonszensz mutációja új eredménynek bizonyult. Mivel a mutáció STOP kodon kialakulásához vezet, mely trunkált fehérjét eredményez, a változást patogén eltérésnek tartjuk. Ezt az elképzelést támasztja alá a 4 vastagbél daganatban szenvedő beteg hordozó állapota.

A 3. exon misszensz mutációja már több szerző által közlésre került, mint nem patogén polimorfizmus (Samowitz 2001). Az amerikai populációban való előfordulását 0.02-nek adja meg a „The National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project”, mely 4 %-os heterozigota előfordulást jelent.



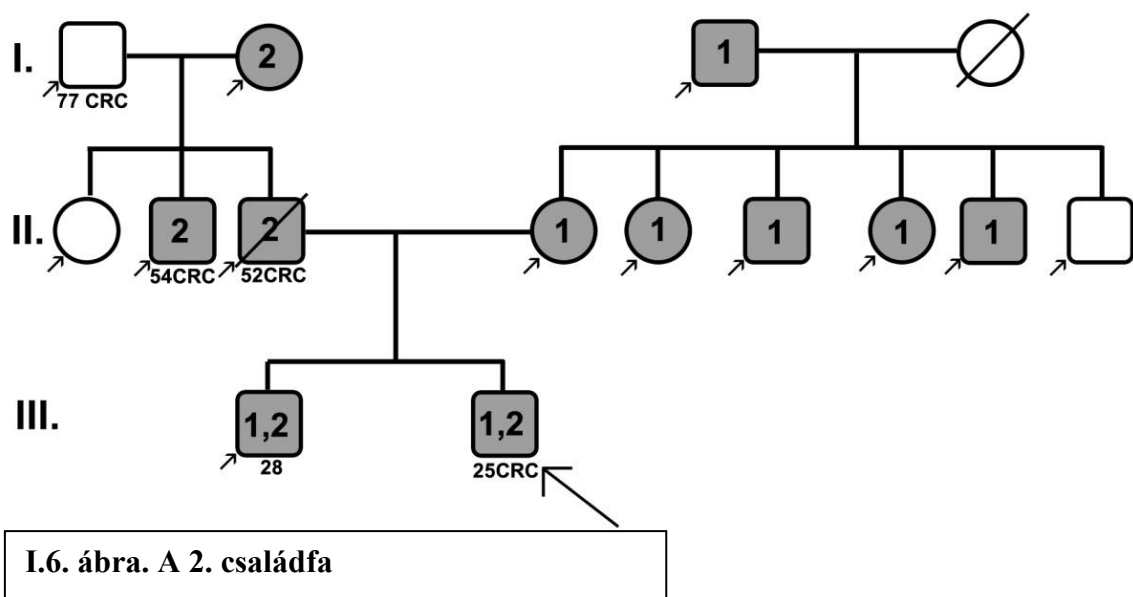
I.5. ábra Az 1. családfa

A család két tagja csak a patogén mutációt hordozta, a CRC 43 és 56 éves korukban alakult ki. Bár a 3. exon mutációja polimorfizmusként ismert, a család másik 2 tagjában, akikben mindkét mutáció jelen volt, a CRC 31 és 34 éves korban jelentkezett. A jelenség okaként esetleg szóba jöhet a nem patogén mutáció jelenléte is, illetve olyan egyéb mutáció, vagy epigenetikus változás (Valeri 2010) az MMR családdhoz tartozó más génekben, melyet nem vizsgáltunk tanulmányunkban. Az index személy öccsét 28 éves korában vizsgáltuk, mindkét mutációt hordozza, de valószínűleg fiatal kora miatt még nem alakult ki benne daganat. Valamennyi mutáció hordozó személy magas rizikójúnak tekintendő, akik rendszeres gondozást igényelnek. Ennek tulajdonítható, hogy colonoscopia során az index személyből 4 év alatt tubulo-villosus adenomát távolítottunk el.

## 2. Család

A 25 éves fiatalember szinkron rectum és mucinosus coecum adenocarcinoma miatt subtotalis colectomián esett át klinikánkon. A családi anamnézis szegényes, mindössze a 77 éves nagyapa volt érintett CRC által az apai ágon (I.6. ábra). Más carcinoma nem fordult elő ebben a családban. Az index személy 28 éves bátyjából egy tubulo-villosus adenomát távolítottunk el. A Bethesda kritériumok alkalmazása vetette fel a gyanút az LS-re. Immunhisztokémiával az MLH1 és az MSH2 expresszió negatívnak bizonyult. Az MS státusz nagyfokú instabilitása támogatta a diagnózist. Az MLH1 promóter hypermetilációját ki tudtuk zárni. Ezek után végeztük el a két gén 35 exonjának a szekvenálását, mely az MLH1 19. exon 716. kodonjában Val → Met cserét, valamint az MSH2 13. intron 2210 + 1 G >C nukleotidjának cseréjét mutatta ki. 15 családtagot vizsgáltunk meg összesen, akik közül az anyai ágon 8 személyben igazoltuk az MLH1 mutációját, és az apai ágon 5 családtagban az MSH2 mutációt. Az MLH1 19. exon mutációját illetően ellentmondó közlemények láttak napvilágot. Míg Hutter és munkatársai úgy vélték, hogy az eltérés patogén, Cederquist és munkatársai polimorfizmusnak vélik a mutációt. (Hutter 1998, Cederquist 2004). Saját adataink jobban

alátámasztják a mutáció polimorfizmus jellegét tekintve, hogy 8 hordozó családtagból mindössze 1 volt beteg a vizsgálatunk idején. Az MLH1 fehérje vizsgálat szerint a mutáció egy nem konzervatív szakaszon helyezkedik el, és az adatbázisok ebben a régióban több más polimorfizmus leírását is tartalmazzák.

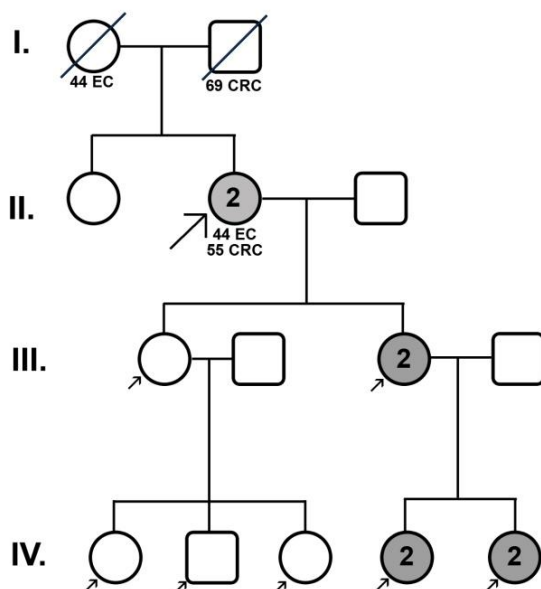


Az MSH2-ben feltárt 13. intron 2210 + 1 G > C patogén mutációként már korábban leírásra (Kurzawski 2002). A mutáció leolvasási kereteltolást okoz az exon-intron határon. A második családban ez az elváltozás 5 személyben volt kimutatható. Az adatok gondos értelmezésére hívja fel a figyelmet, hogy az apai nagyapa aki 77 évesen CRC-ben szenvedett ezt a mutációt nem hordozta, azaz sporadikus vastagbélrákos betegnek tekinthető. Az index személy bátyjából szűrés során adenomatosus polypot távolítottunk el endoszkóposan. A többi családtag gondozásba vételével kapcsolatban sajátos problémába ütköztünk, a kooperáció hiánya miatt. A részletes felvilágosítás ellenére sem sikerült érzékeltetnünk a betegség kialakulásának veszélyét, és szűrésre a testvérpáron kívül többen nem jelentkeztek. Az index személy édesapja került tünetek miatt vizsgálatra CRC miatt, egyidejű prostata daganattal. Az előbbi még reszekábilis volt, a prostata carcinoma, viszont kiterjedt paraaorticus nyirokcsomó

metastasist adott, melynek következtében a beteg 9 hónappal később elhunyt. Az édesapa testvére más intézetben került előrehaladott végbéldaganat miatt rectum exstirpatoria.

### 3. Család

A proband 44 éves korában endometrium, majd 56 évesen colon descendens adenocarcinomában szenvedett. Szülei ekkor már nem voltak életben, édesanyja 48 évesen endometrium, édesapja 69 évesen gyomor daganat miatt halt meg (I.7. ábra). A nagyszülőkről idevágó információval nem rendelkeztek. A család kis létszáma és a szegényes anamnézis ellenére a jellegzetes, fiatal korban jelentkező CRC és EC együttese LS lehetőségére hívta fel a figyelmet. IHC során MSH2 negatívnak bizonyult a tumor szövet és a mikroszatellita vizsgálat MSI-H státuszt igazolt. A szekvenálás során az MSH2 13. exon 711. kodon Arg→STOP változást sikerült igazolnunk. A patogén mutáció a nemzetközi adatbázisokban már szerepelt, lengyel és koreai családokban került leírásra. Az utóbbiakban gyomorrákkal együtt előfordulva mutatták ki, amely az endometriumrák helyett a második leggyakoribb daganat a CRC után Koreában (Kim 2001). A család összesen 8 tagjának DNS-ét sikerült

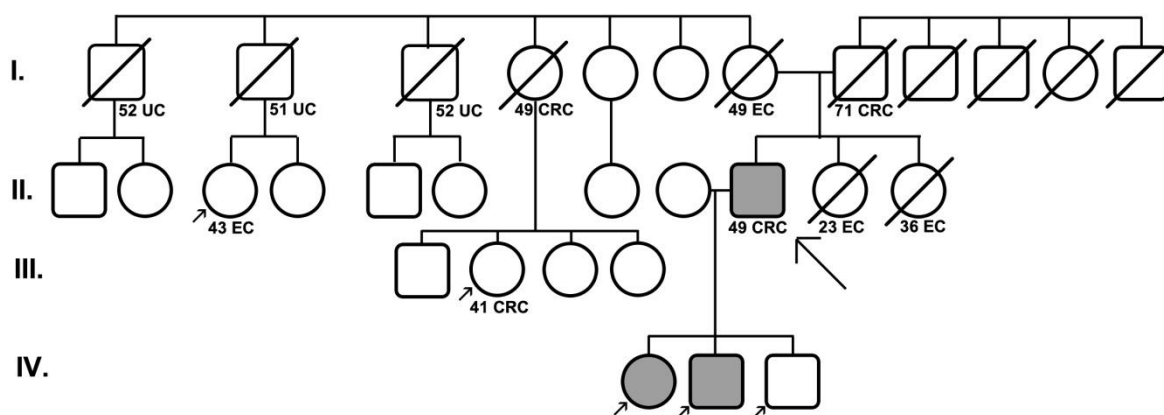


I.7. ábra. A 3. család

megvizsgálunk, további 3 személyben mutattunk ki mutációt. Ellentétben a második családdal itt a felvilágosítás rendszeres nőgyógyászati és colonoscopos vizsgálatokhoz vezetett, mely több adenomatosus polyp eltávolítása révén megakadályozta a malignus betegség kialakulását.

#### 4. Család

A 49 éves férfi flexura hepatica adenocarcinoma miatt került műtetre. Családi anamnézise azonnal felkeltette a figyelmet LS irányban (I.8. ábra). Két húgát 23 és 36 évesen veszítette el endometrium carcinoma következtében. Édesanyjának 49 évesen endometrium, édesapjának 71 évesen végbélrákja volt. Az anyai ágon fordult még elő 3 húgyúti daganat, endometrium, és vastagbél daganat. Az IHC vizsgálat az MLH1 festődésének a hiányát mutatta ki, MSI-H jellegzetesség mellett. A gén nagy szakasz delícióját sikerült kimutatni MLPA vizsgálat segítségével, mely az adatbázisok szerint új mutációnak bizonyult (INSIGHT). A delíció 1786 bp veszteséget okozott a 11. exon 301. kodonjában kezdődve, 11. intronban végződve (g.28756-g.305429). A kereteltolásos mutáció a fehérje heterodimer képzésért (MLH1-PMS1/2) felelős szakaszának funkcióját szünteti meg.

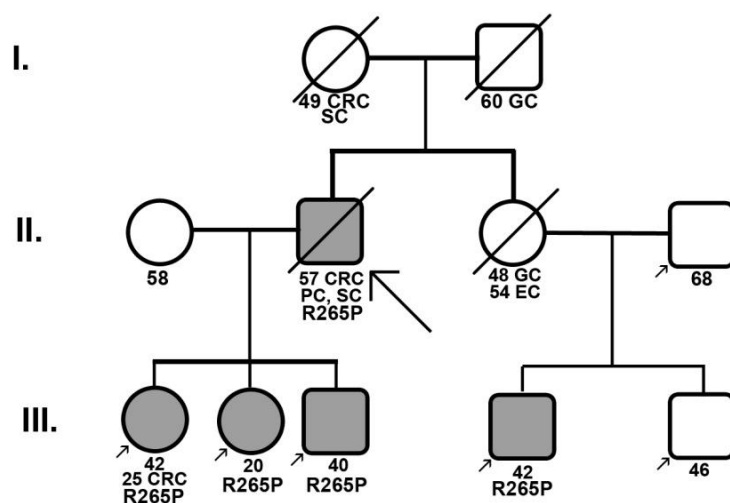


I.8. ábra. A 4. család

A nagy számú családtag vizsgálatával, az anamnézis feltárásával típusos LS család került látóterünkbe, akikben azonban elsősorban a LS asszociált daganatok domináltak. A genetikai vizsgálatba itt sem sokan egyeztek bele, és a szűrésben, gondozásban való együttműködés is sajnálatosan alacsony fokú volt.

## 5. Család

Az 57 éves férfi anaemia tüneteivel került colonoscopiára, melynek során a coecum mucinosus adenocarcinomája igazolódott. Kivizsgálás során CT a pancreasban is térfoglalást írt le. Mindemellett a távolabbi anamnézisben „börkinövések eltávolítása szerepelt”. Saját vizsgálatunk idején az index személy nyakán helyezkedett el bőrelváltozás. Előkészítés utáni műtét során a coecum daganat miatt jobb oldali hemicolectomia történt, de sajnos a pancreas folyamat inoperábilisnak bizonyult. Figyelmünket azonban már felkeltette a többszörös tumor előfordulás és biopsziát vettünk a hasnyálmirigy daganatból és a bőrelváltozás teljes egészében eltávolításra került (I.9. ábra). Az IHC vizsgálat negatív volt MLH1 festődés tekintetében, az MSI státusz nagyfokú instabilitásra utalt. Szekvenálással az MLH1 gén csírasejtes mutációját találtuk a 10. exonban, Arg265Pro cserével. (c.794 G→C, misszensz mutáció).



I.9. ábra. Az 5. családfa

A családfa analízis az index személy édesanyjában 49 évesen, lányában 25 évesen fedezett fel CRC-t, édesapjában 60 évesen, nővérében 48 évesen derült fény gyomor tumorra, és ugyancsak a nővérében 54 éven endometrium daganatra. Az ismert mutáció birtokában elvégeztük a családtagok mutációs vizsgálatát is, összesen 5 személy esetében. Közülük 4-ben mutattuk ki a genetikai eltérést. További 3 tumoros családtagok elhalálozás miatt nem tudtunk vizsgálni.

A tumoros halmozódás a családtagokban és a többszörös bőr tumor jelenléte az index személyben vetette fel a Muir-Torre szindróma lehetőségét, melyet ma az LS szindróma egyik variánsának tekintenek. Az első leírások 1967-ből és 1968-ból származnak (Muir 1967, Torre 1968). A betegség az LS egyéb megnyilvánulásaitól a faggyúmirigyekben megjelenő bőr tumorokkal különíthető el, melyre első alkalommal Lynch utalt 1981-ben (Lynch1981). Az MTS előfordulási aránya az LS-en belül 1-10 % körül mozog (Ponti 2006, Lynch 2006), és a CRC megjelenését a bőrelváltozások időben jelentősen megelőzhetik (60 % körül). Amennyiben a recidiváló bőr tumorok felhívták volna a vizsgálatot korábban végző orvos figyelmét az öröklődő jellegre, egy jól kivitelezett szűrő programban való részvétel potenciálisan megmenthette volna a beteg életét. A hasnyálmirigy daganat HNPCC asszociálta előfordulásáról kevés közlés szerepel az irodalomban, MTS-ben pedig nem találtunk erre való utalást.

A klinikai kép háttérében álló MLH1 10. exon c.794 G→C cserével járó misszensz mutáció Arg→Pro helyettesítéssel jár. Mivel nem találtunk erre utalást a vizsgált adatbázisokban, a mutációt új patogén mutációként tartjuk számon. Hasonló pozícióban kialakult misszensz mutáció közlésére találtunk adatot egy szlovák LS család leírásában (MLH1 c.793 C→A, Arg→Ser) (Zavodna 2006). A 29 éves probandban colon ascendens daganat, családjában endometrium daganat, vastagbél polyp és malignus melanoma fordult elő. A szerző a mutációt a családi kép alapján patogénnek gondolja. Szintén a 793 pozícióban C→T,



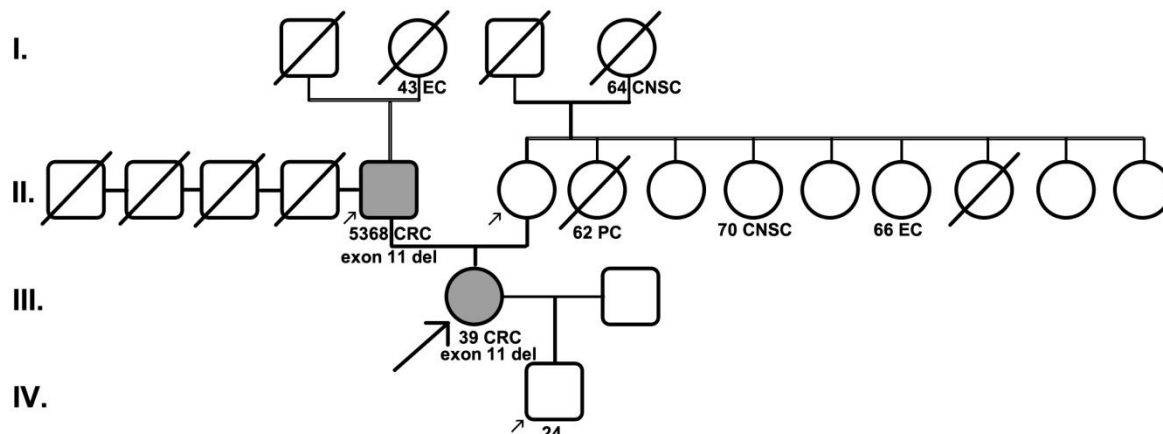
Arg→Cys változást okozó mutációt írtak le egy cseh LS család esetén, melyet szintén patogénnek véltek (Plevova 2004). Ezt a patogén mutációt 1999-ben már mások is megerősítették.

Érdekes és sokszor nem könnyen eldönthető kérdés, hogy egyes, vagy többszörös mutációk előfordulása esetén melyik tekinthető patogénnek. Az LS-ről bővülő információ halmaz a kérdés megoldása helyett sokszor további kérdéseket vet fel, mint amilyen az epigenetikus modifikációk lehetősége, például microRNS-ek által (Valeri 2010, Hutchinson 2013). A genetikai változás sem biztosan okoz következményes funkció változást, ha a fehérje konformációja nem változik meg alapvetően. A kérdés megközelítésére az aminosav cserék okozta funkcionális változásokat vizsgáló szoftvereket hoztak létre különböző munkacsoportok (Win 2014). A számítások figyelembe veszik az aminosav csere enzimatikusan aktív vagy közömbös régiókban való lokalizációját, az új aminosav tulajdonságait, mely egyértelműen megváltoztathatja a fehérje funkcióját. Három különböző programot próbáltunk ki az új mutáció patogén jellegének eldöntésére: „ártalmas” (SIFT), „patológiás” (PMut) illetve „valószínűleg káros” (PolyPhen) véleményezést kaptunk. Azt gondoljuk, hogy ezek az eredmények is megerősítik az Arg265Pro cserét okozó mutáció patológiás voltát.

## 6. Család

A 39 éves nőbetegnél vérszékelés miatti kivizsgálása során sigma daganat igazolódott. Családi anamnézisében halmozottan fordult elő daganatos megbetegedés, édesapja 53 évesen CRC, majd 68 évesen metachron rectum tumor műtétén esett át (I.10. ábra). Apai nagyanyja 43 évesen EC-ben halt meg. Anyai ágon nagyanyja 64 évesen, nagynénje 70 évesen központi idegrendszeri tumorban halt meg. Édesanyja másik leánytestvére 62 évesen endometrium, egy

további leánytestvér 66 évesen tüdő carcinoma miatt került kezelésre. A családi halmozódás felderítése után elkezdtek az LS irányú kivizsgálást.



**I.10. ábra. A 6. család**

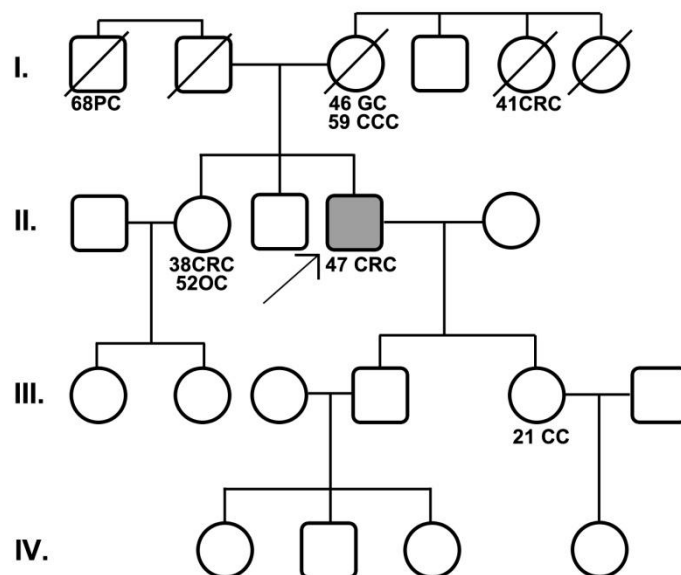
A proband műtete után vizsgált tumor szövet MSI-H-nak bizonyult, az MLH1 és az MSH6 festődés negatív volt. Genetikai vizsgálataink az MLH1 gén nagy delécióját igazolták. A családtagok közül összesen 4 főt tudtunk megvizsgálni. Az index személy és édesapja hordozta a genetikai elváltozást. Az édesanya és a fiúgyermek normális allél jelenlétét mutatta. A további vizsgálatok objektív akadályokba ütköztek az apai oldalon elhalálozások miatt, az anyai ág pedig nem hordozta a kóros gént, így nem is törekedtünk vizsgálatokra.

A 6. családban talált 3.8 kb-s nagy deléció az MLH1 gén 11. exonjának teljes egészét érinti. Az adatbázisokkal való egyeztetés után ez szintén új mutációnak mutatkozott (INSIGHT). Típusosan a deléciót szenvedett gén által kódolt fehérje funkcióképtelen és hamar lebomlik a sejtben létrehozva az MMR kaszkádban a működésképtelenséget. Ennek a családnak is a példája felhívja a figyelmet arra, hogy a több forrásból származó információt gondosan értékelni kell, mielőtt felállítjuk az LS diagnózist. Bár nagyszámú daganat fordult elő a családban az anyai ág nem hordozza az elváltozást, így a fokozott kockázat az ő leszármazottaikban nem valószínűsíthető, az ezzel járó pszichés terhet nem kell hordozniuk. A bővülő ismeretek tudatában azonban az sem kizárható, hogy pl. az alacsony penetranciájú

(onko)génekben felhalmozódó mutációk hozzák létre a daganatok családi halmozódását (Wood 2007).

## 7. Család

A 47 éves férfi puffadás, széklethabitus változás miatt került kivizsgálásra, mely a haránt vastagbél mucinosus adenocarcinomáját igazolta. Kiterjesztett jobb hemicolectomiát végeztünk. A családi anamnézis feltárása során jellegzetes LS családfát sikerült rögzítenünk (I.11. ábra). A proband édesanyja 46 évesen gyomordaganatban szenvedett, majd 59 évesen epeúti daganatba belehalt. Az édesanya nővére 41 éves korában hunyt el, májattéteket okozó vastagbél daganat miatt. Az édesapa testvére 68 évesen hörgőrákban halt meg. A beteg 38 éves húga bal oldali vastagbél és sigmabél szinkron daganata miatt került ellátásra, 52 évesen pedig petefészek tumor miatt Wertheim műtéten esett át. Az index személy egyik gyermeke 21 éves korában endometrium carcinoma miatt conisatióra került.



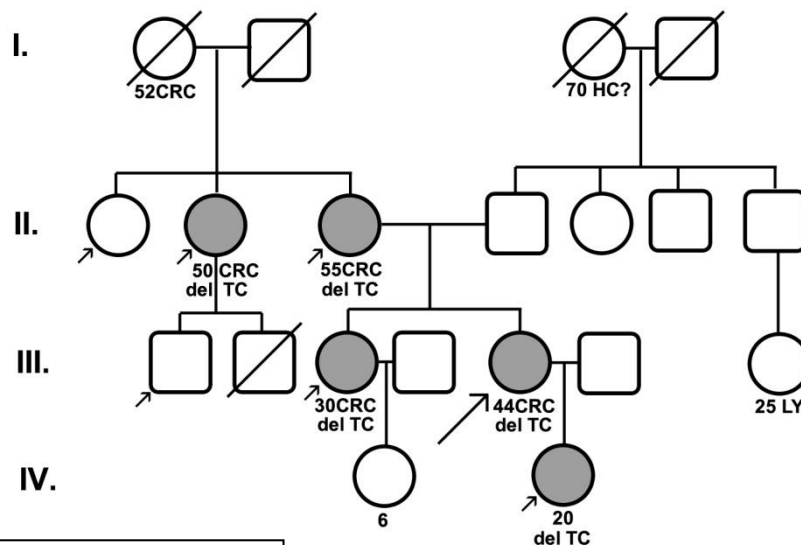
I.11. ábra A 7. családfa

Az index személy vastagbél tumorának IHC vizsgálat MLH1 expresszió hiányt mutatott, az MSH2 és az MSH6 pozitív volt. A nagyfokú mikroszatelita instabilitás tovább erősítette az

eddiggi adatokat, ezért elvégeztük az MLH1 gén szekvenálását. A 2. exon 143. kodon A →C cserével járó misszensz mutációját találtuk (p.Q48P). A pathogenitás eldöntésére a család többi tagjának szűrését terveztük, melyet vallási okokra hivatkozva megtagadtak. A szoftveres előrejelzést alkalmazva egy „egyértelműen pathogén” (PMut) és két „feltehetőleg káros” (SIFT, PolyPhen) véleményt kaptunk. Röviddel saját vizsgálataink után jelent meg Hardt és munkatársainak nagy összefoglaló közleménye a Német HNPCC Konzorcium nevében, mely ezt a mutációt, mint új és patogén elváltozást említi (Hardt 2011, Tanyi 2012). Az index személy követése során adenomatosus polipok eltávolítása történt szövődíjmentesen a vastagbélből. Több családtag nem volt hajlandó a szűrésben, diagnosztikában részt venni.

## 8. Család

A 44 éves nőbeteg intézetünkben való ellátása előtt egy évvel korábban már bal oldali hemicolectomián esett át flexura lienalis tumor miatt más intézetben. Az általunk végzett műtete során a hasfalra törő rectosigma daganatot észleltünk, a kismencedei hashártya apró gócos érintettségével. A folyamat látható tumor visszahagyása nélkül eltávolítható volt, ezért Hartmann műtétet végeztünk. A beteg kemoterápiában részesült, tumormarkerei csökkenő tendenciát mutattak. Egy évvel később a rekonstrukció reményével újabb műtét történt, recidívát nem észleltünk, így a bélfolytonosságot helyreállítottuk. A családi anamnézisben további 4 vastagbél daganatos betegre, 1 bőr, 1 hematológiai és egy rosszindulatú májelhváltozásra derült fény (I.12. ábra). Valamennyi CRC az anyai ágon fordult elő 30,44, 50, 52 és 55 éves életkorban. Az Amsterdam kritériumok teljesülése egyértelműen LS irányába mutatott, így kellő tájékoztatás és beleegyezés után elkezdtek a kivizsgálást. A proband tumor szövetéből végzett immunhisztokémia az MSH2 jelölődés hiányát mutatta, az MLH1 és MSH6 pozitív volt, mindemellett a tumor MSI-H-nak mutatkozott.



**I.12. ábra. A 8. család**

Az MSH2 gén valamennyi exonjának szekvenálása során a 6. exon két nukleotidját érintő kis deléciót találtunk (delTC c.969-970 ) (Insight). További 6 családtag célzott vizsgálata során 4 személy bizonyult hordozónak. Az összesen 5 delécióhordozó családtagból 4-ben CRC fordult elő. A proband anyai nagyanyja szintén vastagbélrákban szenvedett, de ő vizsgálatunk idején már nem volt életben, így a genetikai státusza nem ismert. Adataink ellenőrzése során ezen eredményünk új mutációnak bizonyult, mely kereteltolást okoz, és egyértelműen patogénnek tekinthető. A család tagjai nagyon jól együttműködnek a szűrésben, követésben, újabb daganatot egyelőre nem észleltünk (Tanyi 2012).

#### **A család vizsgálata összefoglalása:**

Összesen 14 patogén mutáció hordozó családot sikerült azonosítanunk, akikben 12 különböző géneltérést találtunk. Hét mutáció az MLH1 génben volt (2 deléció-egy esetben teljes 11. exon-, egy „splice site error” és 4 misszensz mutáció), 5 az MSH2 gént érintette (1 deléció, 1 „splice site error”, 3 nonszensz mutáció). A mutáció „találathi aránya” eddigi vizsgálatainkban magasabbnak mutatkozik, mint egyes nagy esetszámú munkák alapján várható lenne. Egy 6628 beteget felölelő vizsgálat során az AC pozitív betegek mindössze 3.1%-a bizonyult LS szindrómásnak, a saját 4.4%-os találathi eredményünkkel szemben. Azt gondoljuk, hogy ezt az

eredményt az IHC és MS vizsgálat nagyobb arányú elvégzése okozta, míg az USA-ban az MS státuszt csak a szekvenálás előtti lépésként alkalmazzák rutinszerűen (Tanyi 2014).

Tanulságos maga a számtalan formában megjelenő tumor variáció. Valamennyi esetén fel kell merüljön a vizsgáló orvosban a közös genetikai háttér lehetősége, mely néhány rövid kérdéssel tisztázható. Fontos a család hozzáállásának, a családtagok együttműködésének a megnyerése (saját érdekükben). Sokkal hatékonyabb a prospektíven elvégzett családfakutatás, még a bent fekvés alatt, mint utólag kérdőívek segítségével (Tanyi 2004, 2006).

#### **I.4. A betegek és mutáció hordozó családtagjaik gondozásba vétele, tanácsadás**

A **tipizált mutáció hordozók** esetében az észlelt mutációra és az általuk okozott tumorok spektrumára lebontott részletes útmutatók kerültek kidolgozásra európai és amerikai szakértőcsoportok által (Vasen 2013, Giardiello 2014). Legfontosabb megállapításaik között is első a **CRC colonoscopos szűrésének hatékonysága**. Az 1-2 évente rendszeresen ismételt tükrözések egy 2000-ben publikált finn tanulmány szerint a mortalitást 65, a morbiditást 60%-kal csökkentette, egy 15 éves megfigyelési periódus alatt, a nem szűrt populációhoz képest. (Jarvinen 2000). A gyomorrák, bár jóval ritkább a CRC-nél, szintén eredményesen szűrhető 2-3 évente végzett endoszkópiával. Mindkét vizsgálatot rendszeresen felajánljuk az érintett családtagoknak. A CRC esetében számos vélemény a profilaktikus szubtotális vastagbél reszekció mellett foglalt állást, de a jelentős életminőség romlást (gyakori híg székletürítés, gyengülő kontinencia), feltétlenül számításba kell venni az életkor és az esetleg eleve gyengébb sphincter funkció függvényében (Mecklin 2008). Saját gyakorlatunkban is kiterjesztett reszekcióra törekszünk, de legalább a szigmaxig érdemes megtartani a distalis colont, a jobb kontinencia érdekében. Az így megkímélt, rövidebb vastagbél könnyebben ellenőrizhető.

Az **endometrium- és ovariumrák szűrése** nem hozta meg a remélt eredményt, de a profilaktikus műtéti beavatkozás lehetőségét ebben az esetben is javasolt felajánlani a 40 év feletti, családtervezésen túllévő nők számára. Kifejezett a kockázat MSH6 mutáció esetén. Az 1-2 évente végzett vizelet-vér vizsgálat nem megterhelő, hatásfoka azonban alacsony, ezért nem része az ajánlott vizsgálatoknak, ahogy a többi LS asszociált tumort sem lehet még eredményesen szűrni. Jelentős előrelépést tehetünk azonban az idevágó ismeretek terjesztésével, valamint az egyes daganatok korai tüneteinek ismertetésével. Sokan nem értik meg a „**hordozó státusz**” **veszélyeit**, sem saját egészségük, sem a továbbadás szempontjából. Valószínű, hogy inkább a szűrővizsgálatok kellemetlensége áll előtérben, mintsem az általuk szerezhető „egészségnyereség”. Tapasztalataink szerint a hazai lakosságban nem elsősorban a pszichés teher, hanem a betegség lényegének meg (nem) értése játszik fontos szerepet. Ugyanakkor az első néhány kiszűrt daganat, polip bizonyítja a család számára is a gondozás előnyét, ami hosszú távon mindenképpen előnyt jelent az együttműködésben. Az Egyesült Államokban a legnagyobb az irodalma a diagnózis jogi és etikai következményeinek. Jelentősek a vélemény különbségek a felvilágosítási kötelezettség és a magánélet szentsége között. Sokan az egészségügyi biztosításuk, vagy munkájuk miatt aggódnak. Politikai reagálásként már törvény is született a genetikailag érintettek diszkriminációja ellen (Hudson 2008).

Nagy gondossággal és alapos megfontolás után szabad **fiatalokat vizsgálni**. Húsz éves kor alatt még igazolt HNPCC-s családban sem javasolják a szűrővizsgálatokat. A szülőkkel történt egyeztetés után a hordozó státusz felmérhető különösebb megterhelés nélkül, de az eredmény közlésének lelki hatásaira gondolni kell. Javasolt azonban a család index betegében megjelent daganat felfedezési ideje előtt elkezdeni a szűrést a hordozó, de még tünetmentes többi családtagban.

Fontos az **ismeretanyag propagálása az orvos kollégák felé** is: időben-térben elkülönülő rendeléseken láthatják ugyan annak a betegnek és/vagy családnak a bőr, endometrium, gastrointestinalis (CRC, gyomor, vékonybél, pancreas) és idegrendszeri tumorát, amíg valaki összekapcsolja a halmozódás háttérében álló genetikai láncszemet.

A családi halmozódást mutató, de a jelenleg még **nem tisztázott háttérű beteg csoportokra** is ki kell terjeszteni a szűrést, ill. annak lehetőségét fel kell ajánlani. Az adatbázisokból kiszűrt AC és BG pozitív, de IHC és/vagy MSI negatív betegeket és családtagjaikat az FCRCTX kategóriába sorolja a mai irodalom, és az átlagosnál magasabb rizikójú betegeknek kell tekinteni őket, ugyanúgy mint az LLS és a „Constitutional MMR deficiency” szindrómákhoz tartozó betegeket.

**MSI státuszt** kívánatos lenne ismerni a genetikai háttér pontos azonosításától függetlenül, a **sporadikus esetekben is**. Az MSI-H daganatok ugyanis, az 5-FU alapú kezelésre másként reagálnak, felesleges, sőt káros is lehet a „klasszikus” kezelési sémák alkalmazása. Mindemellett a túlélés esélyei jobbak, mint az MSS tumorok esetében (Boland 2010).



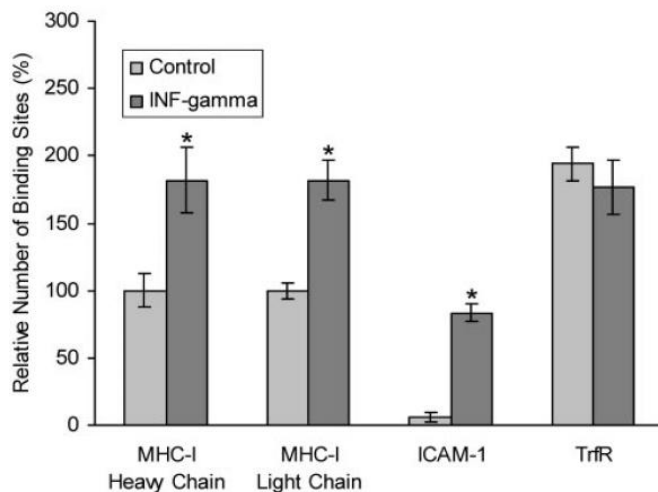
## **II. Sejtfelszíni membrán receptor mintázatok vizsgálata CRC epitheliális sejtvonalon és betegekből származó limfocitákon**

### **II.1-2. LS-174-T CRC sejtvonal plazma membrán mintázatának dinamikus vizsgálata IFN- $\gamma$ és ICAM-1 siRNS hatására az MHCI és ICAM-1 vonatkozásában**

Az immunrendszer megfelelő működésének egyik alapvető követelménye, hogy különbséget tudjon tenni saját és idegen fehérjék között, valamint az antigént észlelő és a megfelelő immunválaszt kiváltó receptorok működése összehangolt legyen. Számos esetben a receptor és a specifikus ligandja közötti kapcsolat kis affinitású, így a válasz kiváltásához a fehérjéknek elegendően nagy számban és koncentráltan kell jelen lenniük a sejtfelszín egy kitüntetett területén. Ugyanakkor, a jelátviteli kaszkádokban résztvevő különböző proteineknek is egymás fizikai közelségében kell lenni (Damjanovich 2002, Vámosi 2005). Korábban bizonyos T és B lymphoma sejtvonalak (JY humán limfoblaszt, HUT 102 B2 humán T limfóma) (Matkó 1994), valamint uveális melanoma (Bene 2004) membránjában egyértelműen kimutatásra került az MHCI és ICAM-1 molekulák szoros, rendezett asszociációja. Koncentrációjuk több más receptorról együtt a plazmamembrán kitüntetett területein, a GM1 gangliozid és magas koleszterin tartalommal jellemezhető lipid tutajban volt megfigyelhető.

Az **LS-174-T hámsejtek** vizsgálata során elsődleges célunk az volt, hogy kimutassuk van-e jellemző receptor asszociáció, valamint a mintázat reagál-e citokin hatásra. Az LS-174 sejteken hasonló mintázatot találtunk, mint amely korábban limfoid sejteken leírásra került. Mindkét receptor a GM1 ganglioziddal jellemezhető lipid tutajban helyezkedett el, az MHCI

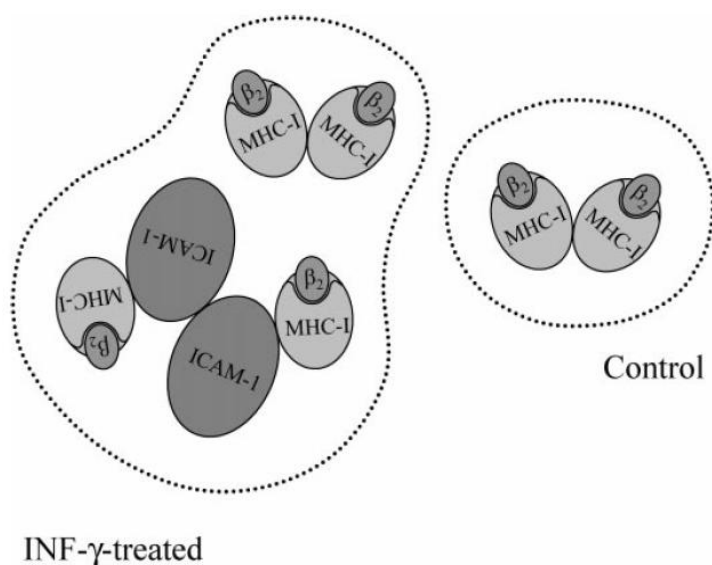
molekulák nagyfokú homoasszociációt mutatva. A 48 órás IFN- $\gamma$  kezelés egyértelmű, reprodukálható változásokat okozott, közel kétszeresére növelte az MHCI és tízszeresére az ICAM-1 receptor számot (II.1. ábra). A negatív kontrollként használt transferrin receptor, mely más típusú membrán területen („coated pit”) helyezkedik el és nem asszociálódik egyik általunk vizsgált receptorttal sem, számaránya szignifikánsan nem változott. Az energia transzfer mérések eredményét intermolekuláris távolság mérésre konvertálva, a sorozatos triangulatio módszerét alkalmazva (Szentesi 2004), azt tudtuk megállapítani, hogy IFN- $\gamma$  hatására az MHCI korábbi homoasszociációjának magas foka csökkent,



**II.1. ábra. IFN- $\gamma$  hatása az MHCI és ICAM-1 expresszióra az LS-174-T sejtek plazma membránjában.** Az MHCI megkétszereződik, az ICAM1 mennyisége közel tízszeresére változik. Negatív kontroll a TrfR.

és az **MHCI molekulák heteroasszociációja nőtt az ICAM-1-hez.** Bár a molekuláris átrendeződés biológiai jelentősége nem ismeretes, korábbi mérések alapján egyértelmű, hogy mindkét általunk vizsgált molekula oligomereket képez különböző tumoros limfociták felszínén. Az MHCI nehéz és könnyű lánc között végzett energia transzfer mérésekkel az is kimutatható volt, hogy a molekulák polarizáltak, egy meghatározott irányban állnak egymáshoz képest. Nem észleltünk változást a kontrollként használt transferrin receptorok abszolút számában és az előbbi 2 receptorhoz való távolságában. Az IFN- $\gamma$  kezelés nem csak

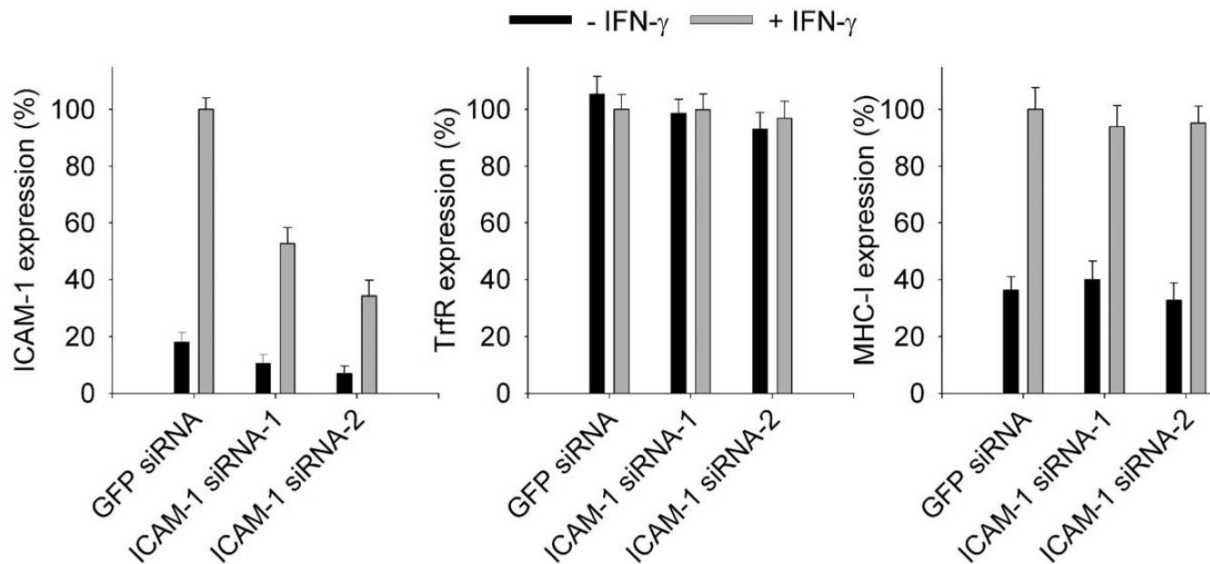
a receptorok számosságát és egymáshoz való viszonyát, hanem az őket befogadó lipid raft méretét is megváltoztatta. Ez utóbbira a koleratoxin-GM1-gangliosid energia transzfer mérésekből lehetett következtetni. A távoli, „coated pitben” elhelyezkedő TrfR homoasszociáció továbbra is nagyfokú volt (azaz az energia transzfer értékek továbbra is magasak voltak a TrfR-ok között) és nem csökkent a távolság a GM1 ganglioside-dal jellemzett rafthoz. Az LS-174-T sejtek mérete, alakja és proliferációs rátája a vizsgálat idő periódusa alatt változatlanul mutatkozott. A két receptor kolokalizációját megerősítettük konvencionális fluoreszcens mikroszkópos és CLSM vizsgálatokkal is. Ennek a vizsgálatoknak az összefoglalása a II.2 ábrán látható vázlatosan: bár az MHCI receptor szám közel kétszeresére nő, az ICAM-1 közbeékelődése miatt az MHCI homoasszociáció foka csökken IFN- $\gamma$  stimuláció után (Bacsó 2002).



**II.2. ábra. IFN $\gamma$  hatása LS-174-T sejtek plazma membránjának receptor konfigurációjára.** Az MHCI számosság jelentősen nő, de a homoasszociációjuk csökken az ICAM1 közbeékelődése miatt (Bacsó 2002).

Az IFN $\gamma$  hatására kialakult receptor mintázat változást az LS-174-T sejtre gyakorolt komplex hatások egyikének is tulajdoníthatjuk, de az is feltételezhető, hogy a két receptor nem random szerűen, pl. a receptorszám növekedése miatt került egymás molekuláris közelségébe. A kérdés további vizsgálatára **RNS interferencia** vizsgálatokat alkalmaztunk.

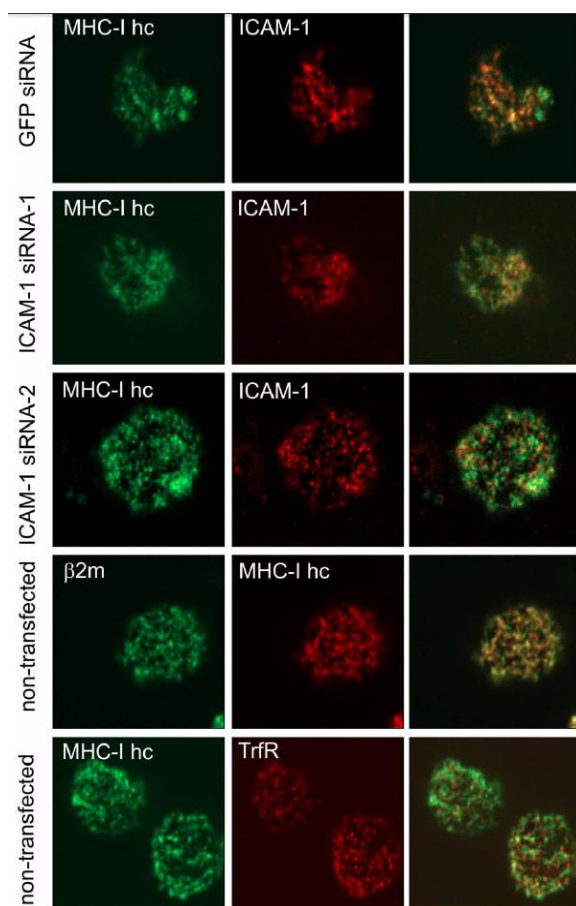
Az ICAM-1 mRNS transzlációját gátló siRNS 8142 és 8233-t alkalmazva azt észleltük, hogy a plazma membránban jelentősen lecsökkent ICAM-1 jelenlét mellett az MHCI homoszociáció foka ismét megnőtt, azaz „visszarendeződött” a IFN- $\gamma$  kezelés előtti helyzetbe. A megfigyelésekből arra következtettünk, hogy az ICAM-1 irányított módon is kerülhet az MHCI molekulák közelségébe. A két gátló RNS közül az siRNS 8233 expressziót csökkentő hatása erőteljesebbnek bizonyult. A kiváltott jelenség specificitását az irreleváns GFP siRNS hatástalansága és a TrfR (ebben a kísérletben is irreleváns, távoli molekula) számosságának (II.3. ábra). és térbeli eloszlásának (II.4. ábra) változatlansága is erősítette. Az IFN $\gamma$  és az siRNS fokozatos kombinált alkalmazásával közel lineáris ICAM-1 expresszió növekedést sikerült kiváltanunk. A receptor membránban való reprezentációjának növekedésével párhuzamosan lehetett kiváltani az MHCI molekulák közé történő „beékelődését”, ami egy dinamikus



**II.3. ábra. Az ICAM-1 siRNS hatása az LS-174-T sejtekre.** Két különböző siRNS-sel transzfektáltuk a sejteket, a GFP siRNS negatív kontrollként szolgált. A receptor expressziót áramlási citometriával határoztuk meg, IFN- $\gamma$  kezelés előtt és után. A referencia alapnak a GFP siRNS-sel kezelt sejtek ICAM-1 expresszióját vettük.

szabályozott folyamatra és nem véletlenszerű történésre utal (Nagy 2006). Az ICAM-1 tumor metasztázis képzésben betöltött szerepéről egyre több információ halmozódik fel. Szerepet

tulajdonítanak az ér- és nyirokér felszínén elhelyezkedő molekuláknak a kissejtes tüdőrák és emlőrák metasztázisainak kialakulásában (Finzel 2004, Kawai 2009), valamint CRC és pancreas tumor sejtek mesotheliumon való megtapadásában (Ksiazek 2010). Kínai szerzők az ICAM-1 polimorfizmus és a gyomorrák rizikója és prognózisa között találtak összefüggést (Tian 2012). A különböző citokinek célzott terápiában játszott hatásmódosító, adjuváns szerepe szintén jelentős irodalommal rendelkezik (Waldmann 2007, Steel 2012). Vizsgálataink egyértelműen arra hívják fel a figyelmet, hogy nem csak egyes receptorok jelenléte, vagy hiánya lehet fontos ezen terápiás módok hatékonyságában, hanem a kaszkádban résztvevő molekulák egymáshoz való térbeli viszonya, orientációja is. A citokinek klinikai alkalmazása esetén valószínűleg azok többlépcsős, esetenként sok támadáspontú szerepét is kell figyelembe venni.



**II.4. ábra. IFN $\gamma$ -val kezelt LS-174-T sejtek vizsgálata konfokális mikroszkóppal.** A két receptor együttállását a narancs színű foltok jelzik (1. sor). Mindkét siRNS gátolta az ICAM-1 expressziót és ezzel párhuzamosan az MHCI-gyel való asszociációját (jól elkülönült zöld és piros területek, 2., 3. sor). Pozitív kontrollként az MHCI nehéz lánc és a  $\beta 2$  mikroglobulin együttesét vizsgáltuk (teljes átfedés, narancs színben tűnik fel, 4. sor). Negatív kontroll a TrfR és az MHCI nehéz lánc egyidejű jelölése (jól elkülöníthető piros és zöld jelölődés, 5. sor) (Nagy 2006).

### **II.3-4. CD4<sup>+</sup> T limfociták plazma membrán mintázatának**

#### **összehasonlító vizsgálata colon tumorban és IBD-ben szenvedő**

#### **betegekben**

A CD4<sup>+</sup> limfocitáknak központi szerepük van az adaptív immunválaszban, hiszen ezek a sejtek segítik a citotoxikus T sejtek és az antitestek által mediált választ is. Szükségesek az immuntolerancia fenntartásában és a saját szervezet számára káros reakciók gátlásában is. Kiemelt szerepüket mi sem bizonyítja jobban, mint a HIV vírus hatására kialakuló súlyos depléciójuk, mely opportunist fertőzésekhez és gyakoribb daganat kialakuláshoz vezet. A korábbi felfogás szerint két fő típusra oszlott a CD4<sup>+</sup> sejtek családja, az IFN- $\gamma$  termelő Th1, intracelluláris patogének ellen ható és a Th2, IL-4 termelő, extracelluláris paraziták ellen aktiválódó sejtekre. A közelmúltban derült fény arra, hogy a korábbi differenciálódási irányok jelentősen bővülnek a Th1, Th2 mellett a Th17 irányban, mely számos specifikus patogén ellen aktiválódik és a regulatórikus (Treg) sejtek irányában, melyek az immuntoleranciát szolgálják, a follikuláris helper sejtek (T<sub>FH</sub>) pedig a B sejtek antitest termelését irányítják. Az összejt jellegű sejtek szinte bármely effektor, memória és regulatórikus irányban tudnak differenciálódni. Számos alcsoport azonban megtart bizonyos fokú „rugalmasságot”, mely lehetővé teszi, hogy újabb antigén stimulus hatására további, vagy más fajta citokineket termelő sejtekké alakuljanak át (Geginat 2014).

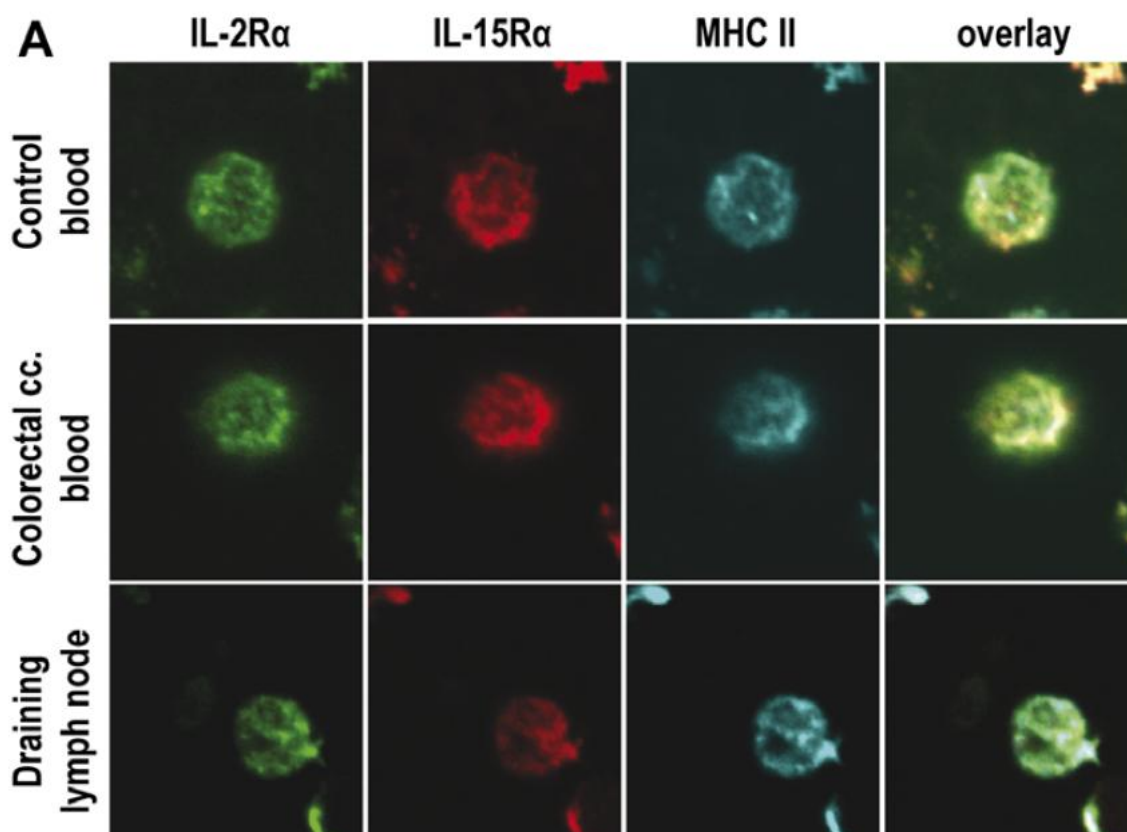
A helper T limfociták a tápcsatornában vannak kitéve a legnagyobb antigén kínálatnak, annak ellenére, hogy az emésztőrendszer minden szakasza speciális mechanikus barierrel van ellátva. Számos bizonyíték szól amellett, hogy a téves immunfelismerés és reakció szerepet játszik az olyan gyulladásos betegségek kialakulásában, mint a colitis ulcerosa és a Crohn betegség (Maynard 2009). A hibás immunfelismerés lehetősége fennáll akkor is, amikor viszont az immunrendszer nem képes felismerni a megváltozott saját sejteket, mint pl. a colonban kialakuló daganat esetében. A plazma membrán mikrodomén szerveződéséről származó adatok elsősorban sejtvonalakon történt mérések eredményei. Vizsgálataink középpontjában az állt, hogy ki tudunk-e mutatni konzisztens különbségeket az általunk korábban is vizsgált raftok mintázatában a colonban zajló tumoros és gyulladásos folyamatok hatására, betegekből származó CD4<sup>+</sup> helper sejteken. Méréseink során az MHCI és MHCII alegységeit, az IL-2 $\alpha$  és IL-15 $\alpha$  alegységeket és az ICAM1 molekulák egymáshoz viszonyított topográfiáját néztük.

**Tumoros esetekben** méréseinket jobb hemicolectomián átesett betegek drenáló nyirokcsomójából és ugyanazon beteg perifériás véréből izolált sejteken végeztük. Kontrollként önkéntesektől származó periférás vért használtunk. Áramlási citometriával először az **abszolút receptorszámokat** határoztuk meg. A betegek perifériás vérmintái nem mutattak jelentős eltérést a kontrollhoz képest. Ezzel ellentétében a tumor drenáló nyirokcsomók CD4<sup>+</sup> sejteiben az MHCI, az ICAM1 és az IL-15R $\alpha$  40-50%-os, az MHCII és az IL-2R $\alpha$  28-35%-os csökkenést mutatott (II.5. ábra). A statisztikai szignifikancia minimum szintjét messze meghaladó csökkenés minden vizsgált proteint érintett. A jelenség önmagában is felveti a lokális „immunparalízis” lehetőségét, hiszen a T sejtek aktivációja IL-2R $\alpha$  alegység számbeli növekedésével és a nagyaffinitású  $\alpha\beta\gamma$  receptor komplexum kialakulásával járna, az MHCII pedig az antigén prezentációban nélkülözhetetlen.

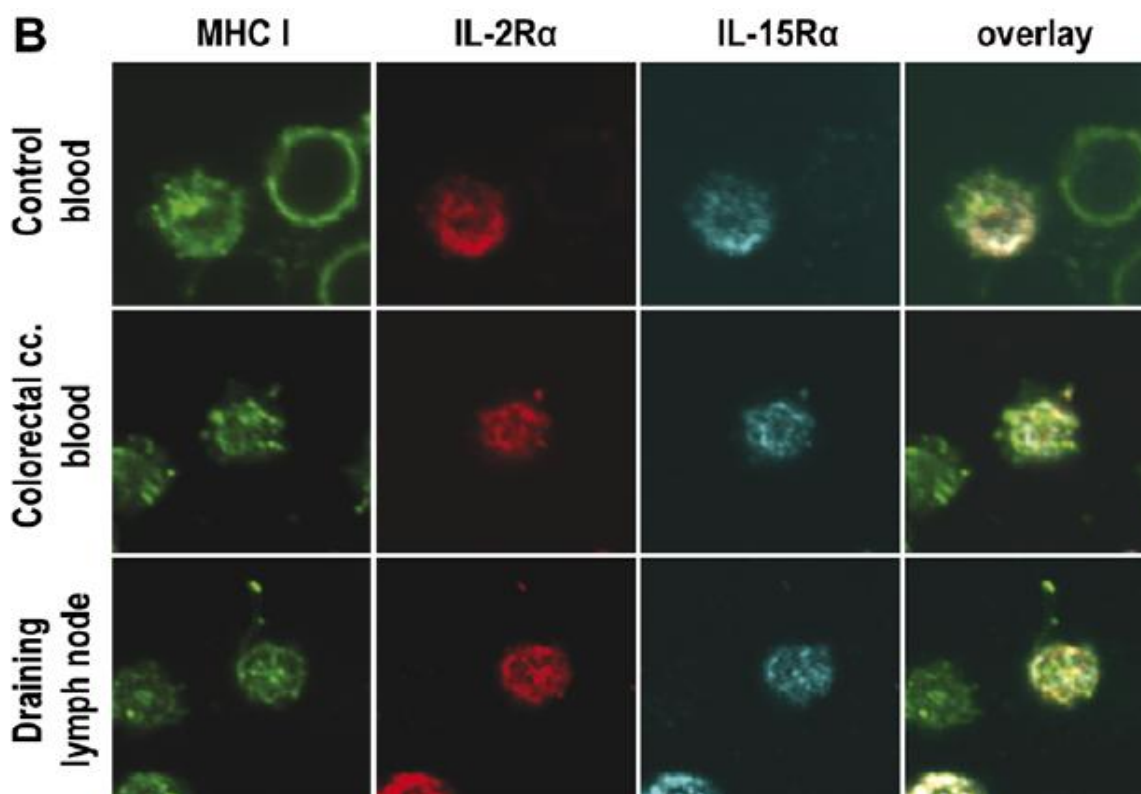
**Konfokális mikroszkópos** vizsgálataink az abszolút receptorszám csökkenés mellett azt mutatták, hogy a receptorok továbbra is a jellemző lipid tutajban helyezkednek el

| Control blood     |                       |                        |
|-------------------|-----------------------|------------------------|
| $\beta_2m$        | 268.4 $\pm$ 36.4 (14) |                        |
| MHC I heavy chain | 216.8 $\pm$ 28.1 (14) |                        |
| MHC II (HLA-DR)   | 42.9 $\pm$ 3.2 (24)   |                        |
| IL-2R $\alpha$    | 54.2 $\pm$ 5.3 (12)   |                        |
| IL-15R $\alpha$   | 16.5 $\pm$ 0.9        |                        |
| ICAM-1            | 10.7 $\pm$ 1.2 (12)   |                        |
|                   | Colorectal            |                        |
|                   | Blood                 | DLN                    |
| $\beta_2m$        | 356.9 $\pm$ 76.5 (4)  | 140.3 $\pm$ 20.8 (18)* |
| MHC I heavy chain | 257.5 $\pm$ 30.6 (6)  | 126.1 $\pm$ 14.6 (18)* |
| MHC II (HLA-DR)   | 36.7 $\pm$ 7.1 (10)   | 31.1 $\pm$ 4.0 (16)*   |
| IL-2R $\alpha$    | 57.6 $\pm$ 8.4 (6)    | 35.0 $\pm$ 4.4 (9)*    |
| IL-15R $\alpha$   | 13.1 $\pm$ 4.6        | 6.4 $\pm$ 2.3*         |
| ICAM-1            | 12.1 $\pm$ 1.2 (6)    | 6.1 $\pm$ 0.5 (5)*     |

**II.5. ábra. CD4<sup>+</sup> sejtek receptor expressziója.** A megadott számértékeket  $10^3$ -al szorozva közelítőleg az abszolút receptorszámot kapjuk meg, a zárójelben levő számok a független mérések számát jelentik. A csillaggal jelezett értékek szignifikánsan különböznek a kontrolltól ( $p < 0.05$ ).



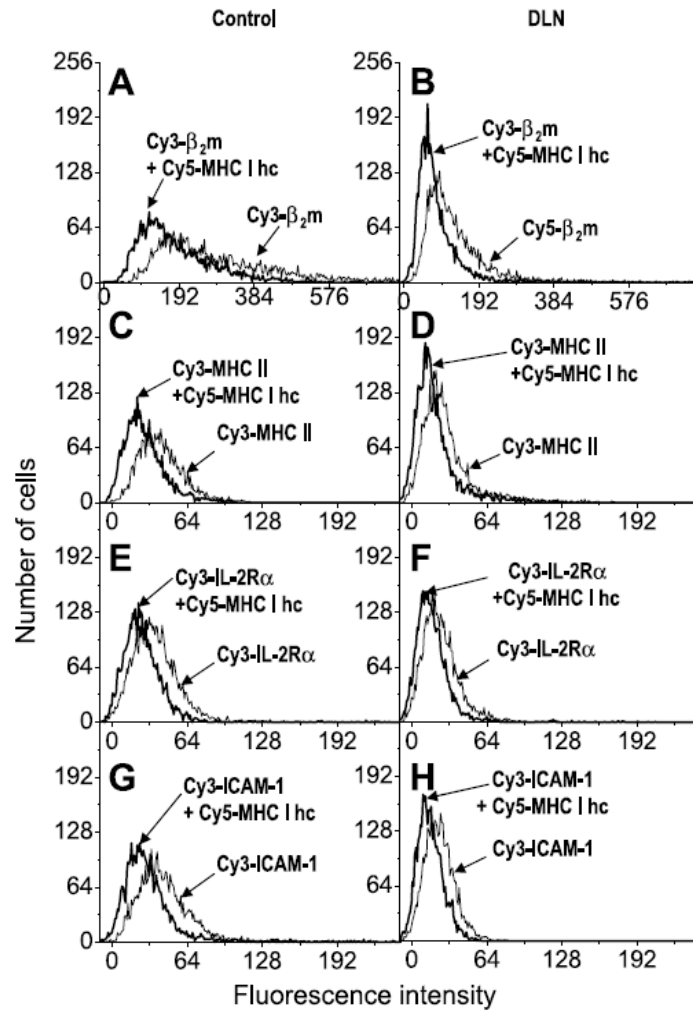




**II.6.A és B ábra. CRC betegek nyirokcsomójából és perifériás véréből származó limfociták konfokális mikroszkópos vizsgálata.** A jobb szélső oszlopban láthatók az egy mikrodoménben elhelyezkedő receptorok jelöléséből származó kevert színek.

(II.6.A és B ábra). A páronkénti áramlási citometriás **energiatranszfer** mérések távolság változásra konvertált eredményei, azonban **jelentős molekuláris átrendeződést** igazoltak. Ezek a változások lényegileg a raftnak a kontrollhoz viszonyított fellazulását mutatták, a receptor sűrűség csökkenés alapján kalkulált értékhez képest jóval nagyobb mértékben. Ezt a feltételezést a FRET mérések akceptorszámra korrigált eredményei is igazolták (Bene 2007). Az áramlási citometriás energiatranszfer méréseink arra is utaltak, hogy a receptorszám csökkenés mellett az egyes **molekulák rafton belüli elhelyezkedése** mutat igazán jelentős különbséget a periférián található limfocitákhoz képest (II.7. ábra). A **II.7. B, D, F, H** ábrákon mind az átlagos fluoreszcencia intenzitás, mind az akceptor jelenlétében mért intenzitás csökkenés kisebb mértékű, mint a kontroll esetén, ami a vizsgált molekulák kisebb számára és egymáshoz viszonyított nagyobb távolságára utal. Az eredményekből azt a következtetést

vontuk le, hogy a tumor közvetlen környezetében cirkuláló limfociták receptor mintázata megváltozik a perifériás és az egészséges egyedekből származó sejteken kimutathatóhoz képest. Az általunk megfigyelt jelenség biológiai jelentősége még nem ismert, de elképzelhető, hogy az egymás mellé rendelt molekulák befolyással vannak az asszociálódott receptor funkciójára. Ramalingam és mtsai 1997-ben az MHCI és az inzulin receptor



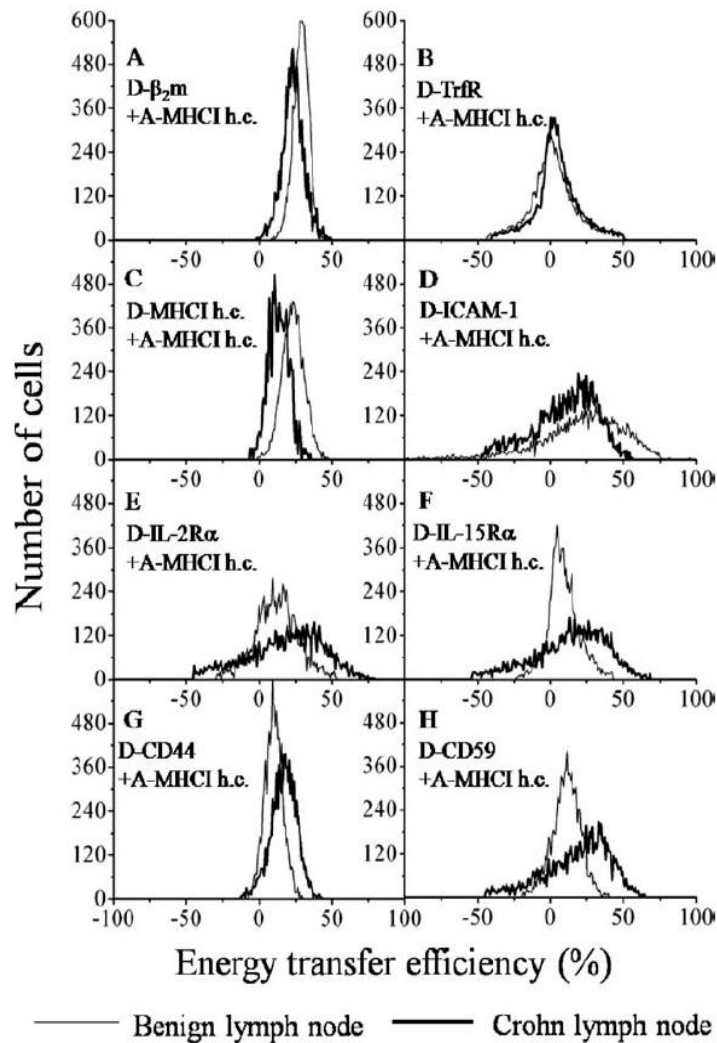
**II.7. ábra. Receptor páronkénti FRET hisztogrammmok perifériás vérből (Control) és tumor drenáló nyirokcsomókból (DLN) származó CD4<sup>+</sup> limfocitákon.** A halvány vonal az akceptor jelenléte nélküli fluoreszcencia intenzitást (Cy3), a vastag vonal az akceptor (Cy5) jelenlétében végzett vizsgálat eredményét mutatja. **A, B:** pozitív kontrol a  $\beta 2$  mikroglobulin és az MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **C, D:** MHCII és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **E, F:** IL-2 $\alpha$  és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **G, H:** ICAM-1 és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés eredménye. A vastagabb vonal által jelzett görbék balra tolódása kisebb transzfer hatásfokot, azaz nagyobb távolságot jelent a molekula párok között.

kölcsönhatására mutattak rá B-sejtes limfóma vonalakon. Az IR mesterséges lipid membránban is az MHCI mellé asszociálódik, az asszociáció élő sejtmembránban is megtörténik. Az MHCI - IR arány növekedésével 1:1-től 1:20-ig nő az inzulin receptor ligand iránti affinitása, az IR autofoszforilációja és az MHCI molekula foszforilációja, valamint a foszfoinozitol 3-kináz aktivitása. Az IR által mutatott funkcióváltozásokat a szerzők egyértelműen az MHCI-gyel történt asszociációval kapcsolják össze.

A tumoros betegekből származó limfocita minták után kíváncsiak voltunk, hogy **a Crohn betegség okoz-e receptor mintázat változásokat a CD4+ limfociták felszínén** (Damjanovich 2012). A tumoros mintákhoz való hasonlítás relevanciáját a betegség immunológiai háttere szolgáltatta, melyet számos korábbi eredmény támaszt alá. Bár a betegséget kiváltó specifikus antigén-antitest kölcsönhatás még nincs azonosítva, az eredmények itt is a helper T limfociták megváltozott szerepére utalnak. Az előzőekben vizsgált receptor panelt (MHCI  $\beta$ 2-mikroglobulin/nehéz lánc, ICAM-1, IL-2/15R  $\alpha$ ,  $\gamma$  alegységek) kibővítettük a CD44s hyaluronsav receptor és CD59 komplement inhibitor molekulákkal. A két utóbbi molekula szintén igazoltan fontos szereppel bír a sejt-sejt kölcsönhatásokba, a homingban és a sejthalál folyamatában, emellett mindkettő alkotója az MHCI köré szerveződő raft protein mintázatnak. Kontrollként nem tumoros egyedekből származó nyirokcsomókat használtunk, akikben jelentős gyulladásos paraméter emelkedés sem volt kimutatható.

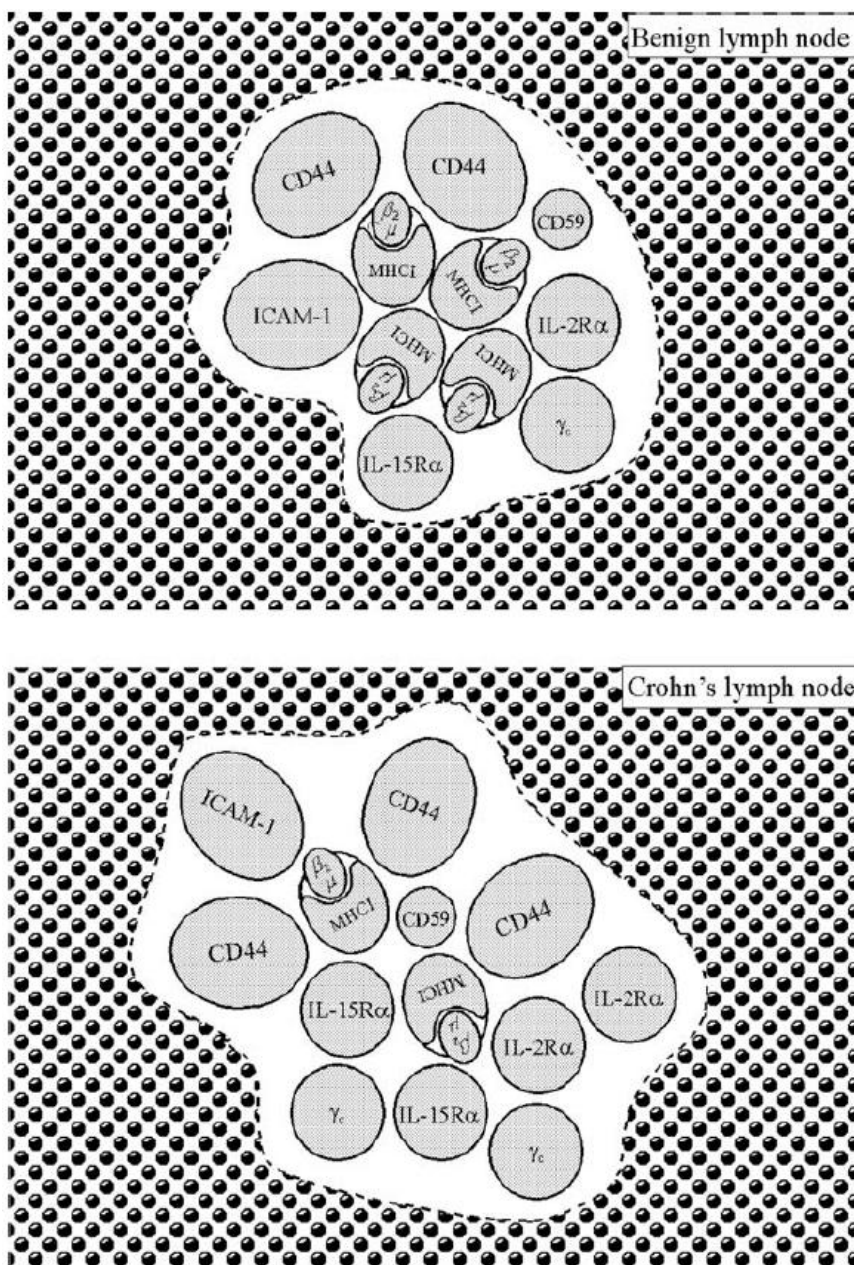
Az **abszolút receptor számok** mérése során az MHCI alegységek tekintetében közel 50%-os csökkenést észleltünk, míg az IL-2/15R  $\alpha$  alegységek 50-70%, a közös  $\gamma$ -lánc 130% emelkedést mutatott a nyirokcsomókból származó CD4+ limfocitákon. A CD44 és a CD59 molekulák száma emelkedett a legjelentősebben, mintegy kétszeresére a kontrollhoz képest. A GM1 gangliozid jelenléte is szignifikánsa nőtt utalva a raft méretének növekedésére. A Trf száma közel változatlan maradt. A **páronként intermolekuláris FRET**

mérések eredményei a Crohn betegség esetén is jelentős átrendeződést mutatottak a rafton belül. Az MHCI molekulák homoasszociációjának csökkenését az ICAM-1 hasonló távolodása kísérte az MHCI-től. Az IL-2R $\alpha$ , az IL-15R $\alpha$ , a CD44 és CD59 molekulák ugyanakkor az MHCI-hez való közeledést mutattak (II.8. ábra). A rafton kívül elhelyezkedő Trf helyzetében nem találtunk változást (negatív kontroll).



**II. 8.ábra. Jellemző páronkénti FRET hisztogramok Crohn betegekből és egészséges kontrollokból származó nyirokcsomó CD4<sup>+</sup> limfocitákon.** A: pozitív kontroll (MHCI nehéz lánc és  $\beta$ -2 mikroglobulin közötti mérés). B: negatív kontroll (MHCI és Trf receptor). C,D: az MHCI-MHCI és az MHCI-ICAM-1 görbék balra tolódnak. A csökkenő transzfer hatásfok távolodásra utal. E,F,G,H: A görbék jobbra tolódása az IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$ , CD44 és CD59 esetén magasabb energia transzfer hatásfokot, azaz a molekulák MHCI-hez való közeledését jelzi.

A nagyszámú mérés eredményeiből kétdimenziós ábrát készítettünk, figyelembe véve a receptorok abszolút számát és a molekulák egymáshoz viszonyított távolságát (II.9. ábra).



**II.9. ábra.** A páronkénti receptor távolság mérés és az abszolút receptorszámok vázlatos ábrázolása Crohn betegekből és kontroll nyirokcsomókból származó CD4+ limfocitákon. A jelek arányosak a receptorszámmal, az MHCI molekula azonban a nagy számossága miatt szükségszerűen alulreprezentált. A hangsúly páronkénti a távolságmérésekből származtatott térbeli elhelyezkedés bemutatásán van.

**A tumoros és Crohn betegekből származó CD4+ limfociták vizsgálati eredményeit összehasonlítva** a következő megállapításokat tettük. A receptor páronként végzett FRET mérési technika alkalmas a lipid rafton belüli finom molekuláris átrendeződések kimutatására. A két vizsgált csoportban hasonlóság volt az MHCI és az ICAM-1 számosságának jelentős csökkenése, a két molekula eltávolodása egymástól és a raft fellazulása. Ellentétes változást mutatott az IL-2/15R  $\alpha$  alegységek, CD44 és CD59 molekulák számbeli reprezentációja, jelentős csökkenést mutatva tumoros mintákon, míg Crohn-os sejteken ezen receptorok száma szignifikánsan nőtt. Ugyanezen molekulák elrendeződésében is ellentétes tendenciát tudtunk kimutatni a két csoport között, míg a tumoros sejteken csökkent az asszociáció az MHCI-gyel („lazább” receptor konfiguráció), addig a Crohn-os sejteken egyértelmű közeledést észleltünk az MHCI irányában.

A FRET vizsgálatok nagy felbontása mellett kiemelendő a kifejezett költség és munkaigénye, ezért nem valószínű, hogy jelen formájában rutin vizsgáló eljárássá válhatna. A **„micropatterning”** (Sunzenauer 2013), a **„nanoscale” vizsgálatokkal** (de Bakker 2007) azonban számos munkacsoport foglalkozik. Különböző utakon próbálják elérni azt, hogy a molekuláris mintázatról képet alkothassunk, funkcionális jelentőségükről információval rendelkezünk és a molekuláris folyamatokba beavatkozhassunk.

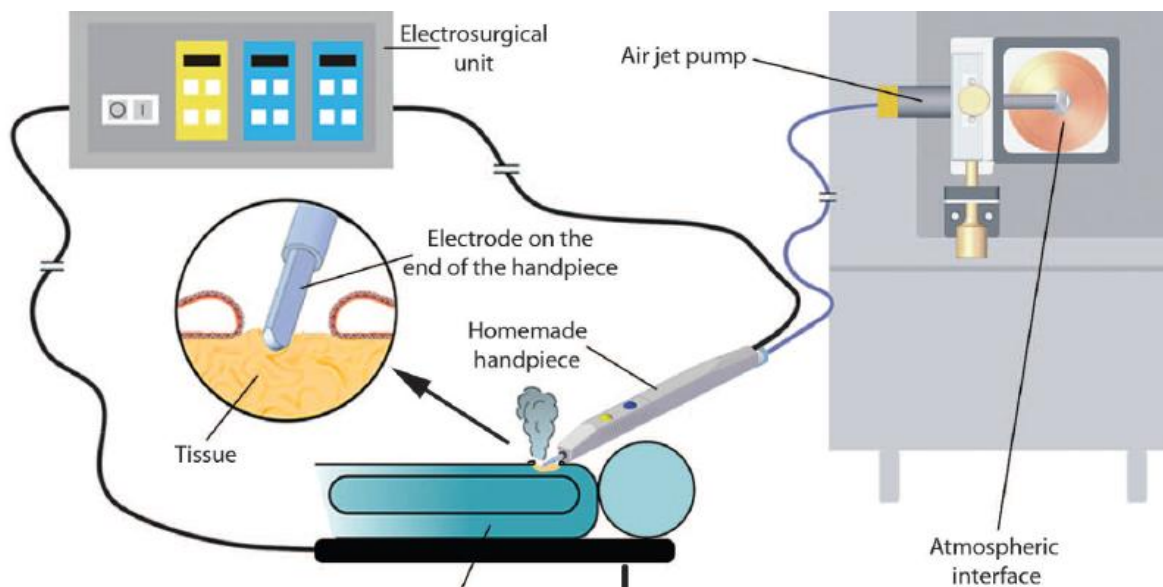
## **II.5. Intraoperatív szövethanalízis gyors ionizáló vaporációt felhasználó tömegspektrometria módszerével**

Biológiai szövetek tömegspektrometriás analízise több évtizede intenzív kutatás tárgya. A gyors vaporizációt felhasználó ionizációs tömegspektrometria (REIMS) egy olyan fejlesztés alatt álló technika, mely alkalmasnak látszik arra, hogy közel valós idejű molekuláris felbontású „szövethanalízist” tegyen lehetővé. A módszer intraoperatív alkalmazásához az elektromos kés használata közben keletkező „füst” elvezetése szükséges. A füstben jelenlévő ionizált molekulák (9 különböző lipid, elsősorban foszfolipidek) analízise teszi lehetővé a szöveti azonosítást. Az elővizsgálatok során egy olyan adatbázis került felvételre mely 1624 daganatos, 1231 egészséges és 78 gyulladásos szövetminta spektrumát tartalmazta. Ezen vizsgálatok azt mutatták, hogy inkább az alkotórészek aránya jellemző az egyes szöveti típusra, nem pedig egy specifikus molekula.

Az adatbázisra alapozva végeztünk méréseket 156 vastagbélrákos, adenomás, és IBD-s betegben, mérést végezve a makroszkóposan ép területeken is. További 16 CRC máj metasztázist és 21 „egészséges” máj mintát analizáltunk. A daganatos esetekben 5.8-6.8% volt a tévesen negatívnak ítélt tumor, metasztázis esetében minden mérés a valós státusznak megfelelő volt. Tizenegy IBD-s beteg 20 spektruma és 7 adenoma 34 spektruma esetén nem volt téves eredmény. Nem volt különbség az in vivo és az ex vivo felvett spektrumok között. A nem vastagbél eredetű szövethanalíziseket is figyelembe véve, a 81 betegből felvett 864 spektrum eredményeit elemezve a módszer szenzitivitása 97.7%, a specificitása 96.5%-nak bizonyult. A fals pozitív arány 3.5%, a fals negatív arány 2.3 % volt.

Primer máj és tüdő tumorok esetében azonban kissé csökkent a specificitás 95%-ra, a fals pozitív arány pedig 6 és 8% lett. A jövőbeli alkalmazhatóságot potenciálisan növelheti az a

megfigyelés, hogy nem csak a szövettani típussal, hanem a változó citológiai grádussal is eltérő spektrum vehető fel. A módszer találati pontosságát mindenképpen befolyásolja a különböző szövettani típusú betegségekről felvett adatbázis, mely viszonyítási alapja lehet az aktuális mérésnek.



**II.5.1 ábra A REIMS intraoperatív működésének modellje.** Az elektromos kés hatására keletkező füstöt tefloncsövön a tömegspektrométerhez vezetjük. A minta beérkezésétől számítva mintegy 0.5 sec-on belül a mérés lezajlik. (Balog J. 2013)

Hasonló következtetésekre jutottak többek között Eberlin és munkatársai (Eberlin 2014), deszorpciós elektrospay ionizációs tömegspektrometria alkalmazása során, agy tumorok ill., gyomor tumorok esetében. A vizsgálat nem kíván előkészítést, gyorsabb mint a fagyasztott szöveti vizsgálat és az értékelés nem múlik a vizsgáló szubjektív véleményén.



## **Összefoglalás**

### **I. HNPCC/LS betegek vizsgálata**

A Debreceni Egyetem Sebészeti Klinikáján ellátott CRC betegekből létrehoztunk egy adatbázist, melyet első lépésben 1997-2010 között retrospektíven, kérdőívek segítségével vizsgáltunk.

Bevezettük a prospektív lekérdezést 2010-től, valamint az anamnézis (Amsterdam, Bethesda kérdőívek) alapján gyaníthatóan pozitív betegek anyagán immunhisztokémiai és mikroszatellita vizsgálatokat végeztünk.

Az IHC és MS vizsgálatok révén kiszűrt betegeket genetikai vizsgálatoknak vetettük alá. A mutációkeresés során 16 hordozó családot sikerült felderítenünk, akik összesen 12 különböző patogén mutációt hordoztak. A 5 újonnan feltárt mutációból 1 misszensz, 3 keret eltolásos és 1 nonszensz mutáció volt, valamint számos már leírt polimorfizmust is kimutattunk.

Az együttműködő családtagokat gondozásba vettük. Ennek köszönhetően vastagbél polipok kerültek eltávolításra, még a malignus növekedési fázis előtt. A genetikai eltérést nem mutató, de anamnesztikus adatok alapján nagy rizikójú betegeknél és családtagjaiknak is folyamatosan felajánljuk a követés lehetőségét és az általa nyújtotta előnyöket.

### **II. CRC sejtvonal epithel sejtjeinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata**

Kísérletes munkáink során CRC sejtvonal (LS-174-T) és betegekből származó CD4+ helper limfociták plazma membránjában szerveződő lipid raftok kompozícióját és változásait vizsgáltuk az MHCI, MHCII, ICAM-1, IL-2/15  $\alpha$ -,  $\gamma$ -alegységek, CD44s, CD59 vonatkozásában.

Kimutattuk, hogy konzisztens receptor mintázatok találhatók a vizsgált sejtek felszínén. Az LS-174-T sejtek esetében IFN- $\gamma$  hatására az MHCI és ICAM-1 relációjában dinamikus átrendeződés megy végbe, mely ICAM-1 siRNS-sel kvantitatíve befolyásolható.

Mind a CRC-s, mind a Crohn betegek drenáló nyirokcsomóiból származó CD4<sup>+</sup> limfociták mutattak receptor számbeli és mintázatbeli különbségeket a kontroll periférás vér CD4<sup>+</sup> sejtjeihez képest, a nanométeres és a mikrométeres tartományban is (nano- és mesoscale). Az eredmények elsősorban arra mutatnak, hogy célzott molekuláris therápia esetén nem feltétlenül elegendő a „target” molekula megcélzása, de a molekuláris környezet figyelembe vétele úgyszintén fontos lehet.

A REIMS technikával végzett méréseink eredményei ígéretesek a közeljövőben kifejlesztendő szövetanalizáló eszköz tekintetében. A mérés gyors és pontosnak mutatkozik. A sejtek lipid összetevőinek tömegspektrometriás analízise lehetővé teheti az intraoperatív diagnosztika fejlődését és a fagyasztott metszet szövettani vizsgálata mellett további segítség lehet a daganatok típusának és dignitásának eldöntésében.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Damjanovich L**, Kósa Cs, Bartha I. A hereditær nonpolyposis colon carcinoma felismerésének gyakorlati jelentősége. Magyar Seb. 2001;54:88-90.

Damjanovich S, Mátyus I, **Damjanovich L**, Bene L, Jenei A, Matkó J, Gáspár R, Szöllösi J. Does mosaicism of the plasma membrane at molecular and higher hierarchical levels in human lymphocytes carry information on the immediate history of cells? Immunol. Letters. 2002;82:93-99.

Bacsó Zs, Bene L, **Damjanovich L**, Damjanovich S. INF- $\gamma$  Rearranges Membrane Topography of MHC-I and ICAM-1 in Colon Carcinoma Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002;290:635-640.

Tanyi M, Kanyári Zs, Orosz L, Juhász B, Lukács G, **Damjanovich L**. A HNPCC klinikai jelentősége, korai felismerésének sebészeti vonatkozásai. Magyar Seb. 2004;57:267-278.

Tanyi M, Kanyári Zs, Juhász B, Lukács G, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tóth L, **Damjanovich L**. A hereditær nonpolipózis kolorektális karcinóma fenotípusának sokszínűsége. Két, igazolt mutáció hordozó beteg családfa analízise. Magyar Seb. 2006;59:411-420.

Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Csuka O, Tóth L, Szentirmay Z, Ress Zs, Bartha Zs, Tanyi JL, **Damjanovich L**. Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 2006;28:1192-1997.

Kámory E, Tanyi M, Kolacsek O, Olasz J, Tóth L, **Damjanovich L**, Csuka O. Two Germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. Pathol. Oncol. Res. 2006;12:228-233.

Nagy P, Vámosi G, Damjanovich S, **Damjanovich L**. ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;347:758-763.

Vámosi Gy, Bodnár A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, **Damjanovich L**. The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. *Immunology Letters.* 2006;104:53-58.

Bene L, Kanyári Z, Bodnár A, Kappelmayer J, Waldmann TA, Vámosi G, **Damjanovich L**. Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4+ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;361:202-207.

Tanyi M, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tanyi JL, Ress Z, **Damjanovich L**. Difficulties in recognizing families with hereditary non-polyposis colorectal carcinoma. Presentation of 4 families with proven mutation. *EJSO* 2008;34:1322-1327.

Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Ress Z, Bubán T, András C, **Damjanovich L**. A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas. *EJSO* 2009;35:1128-1130.

**Damjanovich L**, Volkó J, Forgács A, Hohenberger W, Bene L. Crohn's disease alters MHC-rafts in CD4+ T-cells. *Cytometry A.* 2012;81:149-164.

Tanyi M, Olasz J, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Bubán T, András Cs, Urbancsek H, Garami Z, Csuka O, **Damjanovich L**. Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families. *Familal Cancer.* 2012;11:519-524.

Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K, Mirnezami R, Dezső B, **Damjanovich L**, Darzi A, Nicholson JK, Takáts Z. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Science Transl. Med.* 2013;5:1-11.

dc\_1009\_15

Tanyi M, Olasz J, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Rész Z, Bubán T, Palatka K, András C, Urbancsek H, Garami Z, Csuka O, **Damjanovich L.** MLH1 and MSH2 mutation screening in HNPCC families of Hungary – Two new MMR gene mutations. EJSO 2014;40:1445-1452.

## Köszönetnyilvánítás

Általános orvoskari diplomám megszerzése óta az a szerencsés helyzet kísért, hogy olyan munkahelyeken dolgozhattam ahol a daganatkutatás, a diagnosztika és később a daganatos betegek ellátása kiemelkedő szerepet játszott. Ez a nagyon kiterjedt és izgalmas terület engem is magával ragadott és a mai napig is személyes kihívásnak tekintem, ha egy daganatos beteg gyógyulása reményében hozzám fordul segítségért. Pályám elején 1984-ben, fiatal patológusként **Gomba Szabolcs Professzor** Intézetében kezdtem dolgozni, majd, a philadelphiai Wistar Intézetben, **Prof. Dr. Clayton A. Buck** laboratóriumában kaptam 3 éves ösztöndíjat. Fő témánk az integrin kutatás volt. Legtöbbet főnökömnek és **Dr. Steven Albeldának** köszönhetek.

Hazatérve, 1992-ben a klinikum felé fordultam **Balázs György Professzor** Sebészeti Klinikáján. Tőle kaptam lehetőséget, hogy az Erlangeni Egyetem Sebészeti Klinikáján is tanuljak onkológiai sebészetet **Prof. Dr. W. Hohenbergertől**. Mindemellett próbáltam az elméleti intézetekben adódó lehetőségeket (Debreceni Egyetem Biofizikai Intézet, Országos Onkológiai Intézet) kihasználni és a kutatási tevékenységemet is folytatni. Édesapámnak, **Prof. Dr. Damjanovich Sándornak** köszönhetek ezen a téren a legtöbbet. Ekkor is a daganat progresszió során kimutatható eltérések vizsgálata volt a fő cél. Tumorsejtek és limfociták sejtmembrán receptor klasztereit vizsgáltuk, elsősorban **Dr. Bene László** segítségével.

A klinikum felől közelítve számunkra új területen is elkezdtünk dolgozni és az öröklődő vastagbél daganatok egyik formáját, a HNPCC-t kezdtük el tanulmányozni **Dr. Tanyi Miklós** kollegámmal, az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Laboratóriumának-**Dr. Csuka Orsolya, Dr. Olasz Judit** - majd később a Debreceni Egyetem Patológiai és Laboratóriumi Medicina Intézeteinek- **Dr. Antal-Szalmás Péter, Prof. Dr. Kapplemayer János**- hathatós segítségével.

Az értekezésben nem tárgyalt klinikai onkológiai munkánk során emlő és gyomor daganatok stádium függő progresszióját is vizsgáltuk, melynek a mindennapi sebészi gyakorlatunkra is lehet kihatása. Ezen a területen **Dr. Tóth Dezsővel** működtünk együtt a legtöbbet.

**Hálásan köszönöm valamennyi tanárom, mentorom és társszerző munkatársam segítségét.**

**Köszönöm családom valamennyi tagjának kitartását, szeretét és támogatását.**